สมชาย เมาสูงเนิน : การแยกสารผสมของโปรตีนโดยกระบวนการตกผลึก (SEPARATION OF MIXTURES OF PROTEINS USING CRYSTALLIZATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉลองศรี ฟลัด, 212 หน้า.

ปัญหาหลักสำคัญในการที่จะได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์โปรตีนบริสุทธิ์คือ การแยกโปรตีนที่ต้องการออกมาจากโปรตีนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยให้มีความบริสุทธิ์อยู่ในระดับที่อุตสาหกรรมต้องการใช้ กระบวนการตกผลึกของโปรตีนเป็นประบวนการแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์วิธีหนึ่งที่ถูกใช้น้อยมากในอุตสาหกรรมทางชีวเคมี ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่แยกออกมาได้จะมีความบริสุทธิ์สูง มีอัตราการผลิตที่สูงและง่ายที่จะขยายขนาดการผลิต เนื่องจากมีข้อเสียในเรื่องของการขาดข้อมูลทางด้านอุณหพลศาสตร์และจลนศาสตร์ ที่จะทำให้กระบวนการตกผลึกเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ความเป็นไปได้ที่จะแยกโปรตีนไลโซไซม์บริสุทธิ์ออกจากสารผสมของไลโซไซม์และโอวัลบูมิน โดยศึกษาและทำความเข้าใจอุณหพลศาสตร์ จลนศาสตร์ และพฤติกรรมการตกผลึกของไลโซไซม์จากสารละลายเดี่ยวและสารผสม

ความสามารถในการละลายเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของโปรตีนและสารโดยทั่วไป ความรู้และความเข้าใจในความสามารถในการละลายของโปรตีน นั้นจำเป็นอย่างยิ่งในการออกแบบและปฏิบัติการการตกผลึกของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในระดับอุตสาหกรรม ความสามารถในการละลายของโปรตีนไลโซไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น และมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อค่าความเป็นด่างของสารละลาย (pH) มากขึ้น สำหรับการวัดค่าความเข้มข้นข้นของโปรตีนในสารละลายผสมนั้นมีวิธีการวัดที่ปรับปรุงขึ้นมาสองวิธีการคือ การใช้อิเล็คโตรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลร่วมกับการดูดกลืนแสงยูวี และการใช้การดูดซับแสงยูวีสำหรับโปรตีนผสม การวัดค่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ขึ้นอยู่กับตัวแปรต่าง ๆ มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการศึกษากระบวนการตกผลึกทั้งในระบบโปรตีนเดี่ยวและระบบโปรตีนผสม

เพื่อศึกษาทำความเข้าใจการตกผลึกของโปรตีนให้มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยได้ศึกษาจลนศาสตร์ของโปรตีนด้วยการสร้างแผนภาพวัฏภาคของโปรตีนไลโซไซม์ โดยใช้เครื่องสเต็มอินทิกริตี้แบบสิบหลุม (STEM integrity 10 system) ซึ่งความกว้างของพื้นที่กึ่งสเถียรของแผนภาพวัฏภาคจะขึ้นอยู่กับสภาพของสารละลาย เช่น จะแคบลงเมื่อเติมเกลือเพิ่มลงไป ข้อมูลที่ได้จากแผนภาพวัฏภาคนี้สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยออกแบบและควบคุมกระบวนการตกผลึกได้

การตกผลึกแบบกะของไลโซไซม์ทั้งระบบโปรตีนชนิดเดียวและระบบโปรตีนผสมถูกศึกษาโดยการตกผลึกโดยใช้ตัวล่อ โดยการตกผลึกจะเกิดขึ้นภายในพื้นที่กึ่งสเถียรของแผนภาพวัฏภาค เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการเกิดผลึกใหม่เกิดขึ้น ซึ่งกระบวนการตกผลึกประสบความสำเร็จในการตกผลึกแยกโปรตีนไลโซไซม์ออกมาจากทั้งระบบโปรตีนชนิดเดียวและระบบโปรตีนผสม ผลการทดลองพบว่ากลไกการเติบโตของผลึกถูกควบคุมด้วยกระบวนการการรวมตัวกันที่พื้นผิวของผลึก อัตราการเติบโตของผลึกขึ้นอยู่กับกำลังสองของค่าความเข้มข้นยิ่งยวดสัมพัทธ์ โอวัลบูมินที่เจือปนลงไปในสารละลายจนถึงความเข้มข้น 67.5% ของความเข้มข้นของโปรตีนรวมไม่มีผลกระทบสำคัญอะไรกับการเติบโตของผลึก รวมทั้งความแตกต่างของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ สามและสี่เปอเซ็นต์ก็ไม่มีผลกระทบสำคัญอะไรกับการเติบโตของผลึกด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ดี อุณหภูมิมีผลกระทบต่อการเติบโตของผลึกเป็นอย่างมาก ค่าคงที่ของการเติบโตของผลึกมีค่าเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและเป็นไปตามความสัมพันธ์ของอาร์รีเนียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SOMCHAI MAOSOONGNERN : SEPARATION OF MIXTURES OF PROTEINS USING CRYSTALLIZATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHALONGSRI FLOOD, Ph.D., 212 PP.

PROTEIN SEPARATION/BATCH CRYSTALLIZATION/MIXED PROTEINS/SOLUBILITY/PHASE DIAGRAMS/CRYSTALLIZATION KINETICS/LYSOZYME

The main difficulty in accessing protein products is purifying the many proteins involved in natural products into pure protein fractions on an industrial scale. Protein crystallization is a separation/purification technique little used in the bioprocess industry despite the high purity levels and good separation factors obtained. One of the major drawbacks has been the lack of thermodynamic and kinetic data required for efficient crystallization. This thesis aims to study the possibility to separate pure lysozyme out of the mixtures of lysozyme and ovalbumin by understanding the thermodynamic and kinetic behavior of the crystallization of lysozyme from both pure and mixed solution.

Solubility is a fundamental thermodynamics property of proteins and other species, and is essential knowledge to be able to design and operate industrial crystallizers for any product. The solubility of lysozyme increases with increasing temperature, decreases with increasing sodium chloride concentration, and is slightly reduced at higher values of the pH. Two modified techniques, SDS-PAGE gel + UV-Vis and the UV-Vis for mixtures, were introduced for use in measurement of the concentration of proteins in mixtures. The measurement of solubility as a function of

the parameters is very important in studying the crystallization process in both pure and mixed protein systems.

To extend the understanding of protein crystallization, the kinetics of protein crystallization were studied, with the phase diagrams of lysozyme being determined using the STEM integrity 10 system. The width of the metastable zone depends on the solution conditions, i.e. it is narrower when more salt is added to the mixture. The presence of the phase diagram offers the possibility to use the information for design and control the crystallization process.

The batch crystallization of lysozyme for both pure and mixed systems was studied via a seeded crystallization process. The crystallization was performed within the metastable region to ensure that no nucleation occurs. The successful crystallization of tetragonal lysozyme crystal was performed for both pure and mixed protein systems. The growth kinetics is controlled by the surface integration mechanism. The crystal growth rates were found to be second order with respect to the relative supersaturation. There is no significant effect of ovalbumin impurity, up to the concentration of 67.5% (based on total protein), and NaCl concentrations of 3 and 4%, on the growth of lysozyme crystal. The temperature has a greater effect on the growth of the crystal. The growth rate constants increase with increasing temperature and follow an Arrhenius relationship.

School of Chemical Engineering Student's Signature _____

Academic Year 2015 Advisor's Signature _____

Co-Advisor's Signature _____