โจนัด ไชยะทุมมา: การตกผลึกเอนไซม์ปาเปนโดยใช้เทคนิคการเยือกแข็งตัวทำละลาย (PAPAIN CRYSTALLIZATION USING SOLVENT FREEZE-OUT TECHNIQUE) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตรจารย์ ดร. เล็ก วันทา, 88 หน้า.

คำสำคัญ: ความสามารถในการละลายของปาเปน เทคนิคการเยือกแข็งตัวทำละลาย การตกผลึกด้วยสารต้านการละลาย การตกผลึกด้วยการลดอุณหภูมิสารละลาย กิจกรรมของเอนไซม์

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตกผลึกเอนไซม์ปาเปน (Papain) ด้วยสามวิธีได้แก่ การลดอุณหภูมิสารละลาย การใช้สารต้านการละลาย และการเยือกแข็งตัวทำละลาย (Solvent Freeze-Out, SFO) เบื้องต้นได้การศึกษาความสามารถในการละลายของปาเปน พบว่าความสามารถในการละลายลดลงตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเมทานอล (0–60% w/w) และตามอุณหภูมิที่ลดลง แต่ไม่มีผลกระทบจากค่า pH (5–7) การตกผลึกด้วยสารต้านการละลายเมทานอลได้ผลผลิตเฉพาะเป็นของแข็งแบบอสัณฐาน (Amorphous) เท่านั้น ในขณะที่การตกผลึกด้วยการลดอุณหภูมิสารละลายแบบควบคุมอัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 0.005 °C/นาที ได้ผลึกปาเปนคล้ายเข็มจากการป้อนสารละลายเข้มข้น 0.97 g/mL และ 0.77 g/mL โดยมีอุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystal nucleation) ตั้งแต่ 12.5 °C ถึง –3 °C ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเทคนิค SFO มีประสิทธิภาพเหนือกว่าทั้งสองวิธี โดยประสบความสำเร็จในการตกผลึกสารละลายปาเปนเจือจาง (0.33–0.472 g/mL) ที่อุณหภูมิใกล้เยือกแข็ง (1 °C ถึง –1.5 °C) ด้วยการควบคุมอัตราการโตของน้ำแข็งอย่างแม่นยำ โดยอุณหภูมิสุดท้ายของคอยล์แช่แข็ง (Freeze coil) คือ –14 °C และ –12.6 °C ผลึกที่ได้จาก SFO มีทั้งแบบเข็มและแผ่นผสมกัน ที่มีความเป็นผลึกสูง (ซึ่งยืนยันด้วย PXRD) และ ผลกิจกรรมของผลึกเอนไซม์ปาเปนยังคงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับปาเปนเชิงพาณิชย์ ในขณะที่ร้อยละการผลิตผลึกปาเปนได้ มากกว่า 55% การสูญเสียปาเปนในน้ำแข็ง น้อยกว่า 30% ผลลัพธ์เหล่านี้ทำให้เทคนิค SFO เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการผลิตผลึกโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ผลึกเอนไซม์) ซึ่งจัดการกับข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีการทั่วไป วิธีการนี้เป็นกรอบสำหรับการตกผลึกปาเปนที่สามารถประยุกต์ใช้ตรงกับการผลิตยาได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายชื่อนักศึกษา .....

ปีการศึกษา 2568 ลายชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

CHONUT XAIYATHOUMMA: PAPAIN CRYSTALLIZATION USING SOLVENT FREEZE-OUT TECHNIQUE

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. LEK WANTHA, Ph.D., 88 PP

Keyword: PAPAIN SOLUBILITY, SOLVENT FREEZE-OUT, ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION, COOLING CRYSTALLIZATION, ENZYMATIC ACTIVITY

This work systematically evaluates the solvent freeze-out (SFO) crystallization for producing functional papain crystals. Through phase behavior analysis, we demonstrate that papain solubility decreases predictably with increasing methanol content (0–60% w/w) and decreasing temperature, but shows no measurable effect of pH (5–7); solubility in acetate buffer (pH 5) is comparable to that in water. Preliminary antisolvent crystallization with methanol recovered only amorphous aggregates, while controlled cooling crystallization (0.005 °C/min) generated metastable needle-like crystals from concentrated solutions (0.97 g/mL; 0.77 g/mL), with nucleation temperatures ranging from 12.5 °C to −3 °C. The SFO technique outperformed both methods, successfully crystallizing dilute solutions (0.33–0.472 g/mL) at near-freezing temperatures (1 °C to −1.5 °C) with precise ice-growth control (freezing coil: −14 °C to −12.6 °C). The SFO-derived crystals exhibited defined mixed needle/plate like morphology, high crystallinity (PXRD-confirmed), and preserved enzymatic activity (specific activity unchanged vs. commercial papain), while achieving greater than 55% recovery and less than 30% solute loss in ice. These results establish SFO as a robust approach for producing bioactive protein crystals, addressing critical limitations of conventional methods and serving as an alternative for initially low-concentration feeds. The methodology provides a framework for crystallizing papain, with direct relevance to pharmaceutical manufacturing.

School of Chemical Engineering

Academic Year 2025

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....