บทที่ 3
การตกผลึกโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

บทนำต้นเรื่อง

การเก็บเกี่ยวโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิโดยใช้การกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน สามารถทำให้โปรตีนทั้งหมดในน้ำทิ้งรวมกันอยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้น ซึ่งอาจจะยุ่งยากต่อการนำไปใช้ประโยชน์และเก็บรักษา ดังนั้นควรนำสารละลายโปรตีนเข้มข้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยวิธีที่นิยมใช้ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ได้แก่ การแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี การตกตะกอนและการตกผลึก เมื่อเปรียบเทียบแล้วโครมาโตกราฟีเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงและยังได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนออกมาในรูปของเหลวทำให้ต้องอาศัยการทำแห้งเพื่อกำจัดความชื้นอีกขั้นตอนหนึ่ง (Dwyer, 1993; เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2541) ส่วนการตกตะกอนมีโอกาสได้โปรตีนออกมาหลายชนิดรวมกันซึ่งต้องแยกบริสุทธิ์อีกขั้นตอนหนึ่งเช่นกัน ฉะนั้นการตกผลึกนับว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้อยู่ในรูปของแข็งที่มีความบริสุทธิ์และความคงตัวสูง ทำให้สะดวกในการเก็บรักษาและบรรจุ (Judge *et al.*, 1995; Shenoy *et al.*, 2001)

โดยทั่วไปวิธีตกผลึกมักใช้กับสารละลายที่ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ก่อน (Crude mixtures) (Judge *et al.*, 1998) สำหรับการตกผลึกโปรตีนมีการพัฒนามากในช่วงปลายศตวรรษที่ 19 และสามารถใช้แยกโปรตีนออกจากสารที่ไม่บริสุทธิ์ได้ (McPherson, 1982, 2004) จึงมีความเป็นไปได้หากนำมาใช้กับโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ ในการหาสภาวะที่ทำให้โปรตีนตกผลึกต้องอาศัยการลองผิดลองถูกจากหลายสภาวะซึ่งโปรตีนต่างชนิดกันมีสภาวะที่สามารถตกผลึกได้แตกต่างกัน (Schwartz and Berglund, 2000; Asherie, 2004) การใช้ชุดทดสอบการตกผลึกโปรตีนทางการค้า (Crystallization basic kit for protein) เป็นทางเลือกที่สามารถช่วยให้การคัดเลือกสภาวะทำได้ง่ายขึ้นมาก เนื่องจากในชุดทดสอบประกอบด้วยสารเคมีที่มีบัฟเฟอร์ค่าพีเอช และชนิดสารที่ใช้ตกผลึกที่แตกต่างกันในช่วงกว้าง (Dale *et al.*, 2003) การทดสอบใช้ชุดทดสอบกับเทคนิคขนาดเล็ก (Small scale) สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกในเบื้องต้นสามารถช่วยประหยัดสารเคมีและสารตัวอย่างโปรตีน ซึ่งเทคนิคที่นิยมกันอย่างแพร่หลายคือ Hanging drop (Rayment, 2002) จากนั้นจึงนำสภาวะที่ได้จากชุดทดสอบทางการค้ามาประยุกต์ใช้สำหรับการตกผลึกโปรตีนในระดับใหญ่ขึ้นต่อไป สำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการตกผลึกโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ ทำการทดลองโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้ากับเทคนิคขนาดเล็กเพื่อเป็นแนวทางตกผลึกในระดับใหญ่ขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกโปรตีนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิโดยวิธีการตกผลึก
2. ศึกษาสภาวะที่โปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิสามารถตกผลึกได้
3. ศึกษาการตกผลึกในระดับที่ใหญ่

ตรวจเอกสาร

การตกผลึกเป็นทางเลือกใหม่ที่ใช้เก็บเกี่ยวโปรตีนในอุตสาหกรรมเพื่อทำให้โปรตีนเข้มข้นและบริสุทธิ์ได้ภายในขั้นตอนเดียว จากรายงานของ Jacobsen และคณะ (1998) กล่าวว่าการตกผลึกโปรตีนนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงเหมาะกับเทคโนโลยีการหมัก เพราะผลผลิตโปรตีนที่ได้ ซึ่งละลายปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักมีความเข้มข้นสูงและการปนเปื้อนต่ำอยู่แล้ว หลังตกผลึกสามารถแยกผลึกออกจากสารละลายได้ง่ายด้วยการกรองหรือหมุนเหวี่ยง นอกจากนี้การตกผลึกยังสามารถทำได้ในสารละลายที่ไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากผลึกเกิดจากสารละลายที่อยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดเท่านั้น และโปรตีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายต่างกัน ดังนั้นที่สภาวะหนึ่งโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่สามารถเกิดผลึกได้ส่วนโปรตีนชนิดอื่นที่ละลายปนเปื้อนอยู่ไม่มีสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดจึงไม่เกิดเป็นผลึก (Scopes, 1987) นอกจากนี้การก่อตัวของสารเพื่อให้เป็นผลึกเกิดขึ้นนั้น มีการจับตัวกันอย่างจำเพาะสำหรับสารประเภทเดียวกัน ทำให้สารแต่ละชนิดมีรูปผลึกที่แน่นอน จากหลักการดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Judge และคณะ (1998) พบว่าสามารถใช้การตกผลึกทำให้โปรตีนบริสุทธิ์จากสารละลายที่มีการปนเปื้อนได้ ซึ่งได้ศึกษาการตกผลึกของไลโซไซม์ (Lysozyme) จากไข่ขาวที่มีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อน (Avidin, Ovalbumin และ Conalbumin) ในปริมาณเข้มข้นมากกว่า 50% ปรากฏว่าการปนเปื้อนมีผลกระทบต่อค่าการละลายของไลโซไซม์เพียงเล็กน้อย และผลึกที่ได้ยังคงมีความบริสุทธิ์มากกว่า 99.99%

สภาพสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดไม่ทำให้เกิดผลึกเสมอไปอาจเกิดเป็นตะกอน จึงต้องตกผลึกที่สภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดที่ใกล้กับจุดสมดุลการละลายของสารละลาย (Kierzek and Zielenkiewicz, 2001) ถ้าหากมีความเข้มข้นที่สภาพอิ่มตัวยิ่งยวดสูงมากและระบบเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดตะกอน ซึ่งมีความแตกต่างกับผลึกคือ ผลึกมีรูปร่างที่แน่นอนซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลในสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดอย่างเป็นระเบียบซ้ำๆ กัน ในขณะที่ตะกอนมีรูปร่างแบบอสัณฐาน (Amorphous) เกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลอย่างเดาสุ่ม ทำให้มีรูปร่างและขนาดที่ไม่แน่นอน จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลึกมีความบริสุทธิ์มากกว่าตะกอน (Belter *et al.*, 1998)

Shenoy และคณะ (2001) สรุปข้อดีของการตกผลึก คือ

(1) สามารถใช้วิธีการตกผลึกในการแยกและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

(2) ทำให้ได้โปรตีนในรูปของแข็ง

(3) สารที่อยู่ในรูปผลึกมีความคงตัวในการเก็บรักษามากกว่าตะกอนหรือสารละลาย

ลักษณะของผลึกโปรตีนที่แตกต่างจากผลึกสารโมเลกุลเล็ก คือ (Churdrungsi, 1999)

(1) มีตัวทำละลายในปริมาณมาก โดยผลึกโปรตีนประกอบด้วยน้ำหรือสารละลายประมาณ 30 – 80 % อยู่ในช่องว่างระหว่างชุดโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบหรือเรียกว่าแลตทิช (Lattice) และจะทำให้สูญเสียรูปเมื่อเอาน้ำออก

(2) ผลึกโปรตีนเปราะหักง่ายเนื่องจากมีตัวทำละลายในปริมาณมาก

(3) โปรตีนมีความไวต่อสภาวะการตกผลึก

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกของโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งทางด้านกายภาพและเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน ชนิดและความเข้มข้นของสารช่วยตกผลึก (Bonnete *et al.*, 2001) โดยสภาวะนั้นจะส่งผลให้สารละลายโปรตีนเข้าสู่สภาพอิ่มตัวยิ่งยวดและเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกหรือตะกอนเพื่อปรับให้เข้าสู่สมดุลการละลาย ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกัน (Chayen, 2005)

Luft และคณะ (2001) จึงแบ่งกระบวนการตกผลึกออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

(1) การคัดเลือกสภาวะ (Search or screening stage) คือ การหาสภาวะที่ผลึกเกิดขึ้น

(2) การกำหนดสภาวะที่เหมาะสม (Optimization stage) คือ การปรับปรุงสภาวะที่ทราบในเบื้องต้นเพื่อให้ได้ผลึกที่สมบูรณ์และมีคุณภาพดี

Chayen (1999) กล่าวว่า การคัดเลือกสภาวะเป็นขั้นตอนสำคัญที่ยุ่งยากมากจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ทำในระดับเล็กลงเพื่อช่วยให้การทดสอบจำนวนหลายสภาวะเป็นไปได้เร็วขึ้น เช่น การวิจัยของ Sauter และคณะ (1999) ใช้มากกว่า 50 สภาวะในการศึกษาความสามารถในการตกผลึกของโปรตีน 4 ชนิด (Hen and turkey egg-white lysozyme, Thaumatin และ Sapartyl-tRNA) DeLucas และคณะ (2005) อธิบายว่าการเกิดผลึกโปรตีนให้ได้ขนาดใหญ่ต้องอาศัยระยะเวลานาน เพราะโปรตีนมีความหนืด การแพร่ของสารช่วยตกผลึกที่เติมลงไปและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนสู่ผิวของผลึกเพื่อการโตเป็นไปได้ช้า การลดขนาดการทดลองจึงมีความจำเป็นและประหยัดปริมาณของสารตัวอย่างและสารเคมีอื่นๆ อีกด้วย ส่วนวิธีที่นิยมใช้สำหรับเทคนิคขนาดเล็ก คือ Hanging drop เมื่อหยดของสารละลายโปรตีนรวมกับหยดของสารช่วยตกผลึกบนกระจกปิดสไลด์ ทำให้สารละลายโปรตีนเข้าสู่สภาพใกล้อิ่มตัว จากนั้นนำหยดไปคว่ำเหนือหลุมที่บรรจุสารช่วยตกผลึกในระบบปิด ไอระเหยของน้ำจากหยดจึงระเหยสู่สารช่วยตกผลึกในหลุม สารละลายโปรตีนจึงเข้มข้นขึ้นจนเข้าสู่สภาพอิ่มตัวยิ่งยวด (Mueller *et al.*, 2001)

การกำหนดสภาวะที่นำมาทดสอบยังคงเป็นปัญหาสำหรับโปรตีนที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อนเพราะต้องใช้ปัจจัยหลายด้าน เช่น พีเอช ชนิดบัฟเฟอร์ ชนิดสารที่ช่วยตกผลึก เป็นตัวแปรในช่วงกว้าง แต่ในปัจจุบันมีชุดทดสอบการตกผลึกทางการค้าที่สามารถใช้ร่วมกับเทคนิค Hanging drop ได้เป็นอย่างดี (McPherson, 2004) ตัวอย่างเช่น Crystallization basic kit for protein ของบริษัท Sigma สามารถใช้งานได้ผลรวดเร็วเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยกำหนดการละลายและสภาวะแรกเริ่มที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกของโปรตีน ชุดทดสอบนี้ใช้สารตัวอย่างโปรตีนในปริมาณเล็กน้อย สารละลายในชุดทดสอบประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช และชนิดของสารช่วยตกผลึกที่แตกต่างกันในช่วงกว้าง ข้อดีของชุดทดสอบ คือ

(1) สามารถใช้ได้กับสารตัวอย่างหลายชนิด

(2) สารเคมีที่ใช้มีความบริสุทธิ์และปราศจากเชื้อสามารถป้องกันการเสื่อมเสียโดยจุลินทรีย์

(3) เกิดผลกระทบและผลข้างเคียงน้อย

เมื่อทราบสภาวะที่โปรตีนเกิดผลึกแล้วสามารถนำมาปรับปรุงเพื่อขยายขนาด ซึ่งอาจเพิ่มปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสม ดังรายงานของ Lee และคณะ (2000) ศึกษาการตกผลึกของไลเปสด้วยเทคนิค Hanging drop ภายใต้หลายสภาวะที่มี 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นโปรตีนช่วงระหว่าง 1.93-4.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ช่วงระหว่าง 0.4-2 mM และความเข้มข้นของ 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) ช่วงระหว่าง 27.5-47.5%v/v พบว่าที่สภาวะประกอบด้วย MPD 47.5%, 0.4 mM $CaCl_2$ และความเข้มข้นของโปรตีน 1.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกผลึกมากที่สุดจึงเลือกนำมาทำการทดลองในระดับที่ใหญ่ขึ้นโดยผสมสารทั้งหมดแล้วค่อยเติมผลึกลงในสารละลายเพื่อเป็นการล่อให้ผลึกที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะสมบูรณ์และขนาดใหญ่พร้อมกับการกวนด้วยความเร็วต่ำที่ 200 รอบต่อนาที

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 สารละลายโปรตีนเข้มข้น

สารละลายโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง คือน้ำทิ้งจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) ในกระบวนการผลิตซูริมิที่ใช้ปลาตาหวาน (Bigeye snapper) เป็นวัตถุดิบ เนื่องจาก Waste 4 เป็นจุดน้ำทิ้งที่มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงที่สุดและมีชนิดโปรตีนไม่แตกต่างจากน้ำทิ้งจุดอื่นๆ เมื่อผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันสามารถกักโปรตีน

ได้ทั้งหมด โดยเมมเบรนขนาด 300 kDa ให้ค่าฟลักซ์สูงกว่าเมมเบรนขนาด 100 kDa ดังนั้น Waste 4 ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 300 kDa จึงสามารถทำให้โปรตีนอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้น อีกทั้งยังประหยัดเวลาและพลังงานมากกว่าเมมเบรนขนาด 100 kDa

1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นชุดทดสอบการตกผลึกของโปรตีน คือ Crystallization basic kit for protein No.82009 ของบริษัท Sigma ส่วนสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการตกผลึกในระดับใหญ่ขึ้น และสารเคมีที่ใช้วัดปริมาณและขนาดโมเลกุลของโปรตีน เป็นสารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ดังรายละเอียดในภาคผนวก 6-7

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น GC825 ประเทศเยอรมัน

2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s ประเทศเยอรมัน

2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2100s ประเทศเยอรมัน

2.4 เครื่องมือวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis apparatus) ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein II ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR-20B ประเทศญี่ปุ่น

2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Jovan SA ประเทศฝรั่งเศส

2.7 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000 ประเทศญี่ปุ่น

2.8 ถาดขนาด 24 หลุม (24-Well plate) ยี่ห้อ Costar ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.9 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon รุ่น YS2-H

2.10 โถดูดความชื้น (Dessicator)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

กำจัดตะกอนที่เกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนที่เกิดขึ้นขณะทำให้เข้มข้นด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันโดยนำส่วนรีเทนเททหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Judge *et al.*, 1995) และใช้ส่วนเพอมิเอทเป็นชุดควบคุมการทดลอง เนื่องจากเป็นสารละลายที่มาจากแหล่งเดียวกับตัวอย่างแต่มีความแตกต่างจากตัวอย่างเพียงปัจจัยเดียว คือความเข้มข้นของโปรตีนซึ่งมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบ

3.2 การศึกษาความสามารถในการตกผลึกของโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิด้วยเทคนิค Hanging drop

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างและชุดควบคุม มาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการตกผลึกกับชุดทดสอบการตกผลึกโปรตีนทางการค้า (Crystallization basic kit for protein ของบริษัท Sigma) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 50 สภาวะ ด้วยเทคนิค Hanging drop จัดเตรียมอุปกรณ์ให้มีความสะอาดปราศจากฝุ่นและการปนเปื้อนต่างๆ (Sheehan *et al.*, 1998) โดยเตรียมถาดขนาด 24 หลุม (24-Well plate) ทาน้ำมันกรีสรอบปากหลุม เติมสารจากชุดทดสอบการตกผลึกสภาวะที่ 1 ลงในหลุมปริมาณ 800 ไมโครลิตร แล้วหยดสารละลายโปรตีนเข้มข้น 2 ไมโครลิตร ตรงกลางแผ่นกระจกปิดสไลด์และดูดสารทดสอบการตกผลึกปริมาณ 2 ไมโครลิตร จากหลุมที่ใส่ไว้ตอนแรกผสมกับสารละลายโปรตีนให้เข้ากันอย่างระมัดระวังโดยหลีกเลี่ยงการเกิดฟอง และคว่ำกระจกปิดสไลด์ลงปิดปากหลุมที่บรรจุสารละลายชนิดเดียวกันกับที่หยดผสมกับสารละลายโปรตีน โดยให้หยดของสารละลายอยู่กลางหลุมดังภาพที่ 3-1 ทำเช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนสารจากชุดทดสอบการตกผลึกครบทั้ง 50 สภาวะ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงการกระแทกและสั่นสะเทือน

สังเกตผลการตกผลึกโดยผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายประมาณ 40-100 เท่า (Schwertz and Berglund, 2000) ทุกวันในช่วง 10 วันแรก และหลังจากนั้นควรสังเกตทุกๆ สัปดาห์

3.3 การตกผลึกของโปรตีนเข้มข้นในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิแบบกะ

3.3.1 การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ตกผลึก

โปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิสามารถตกผลึกได้จากสารละลายสภาวะที่ 48 ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5), Ammonium-dihydrogenphosphate ($NH_4H_2PO_4$) 2.0 M

การเตรียมสารละลายในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบการตกผลึกโดยเทคนิค Hanging drop ของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง และเพื่อใช้ล้างผลึกในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลึกดังนี้ คือ

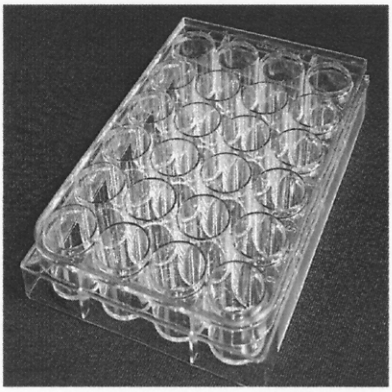
(1) เตรียมสารละลาย $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M

(2) เตรียมสารละลาย Tris-HCl 0.1 M

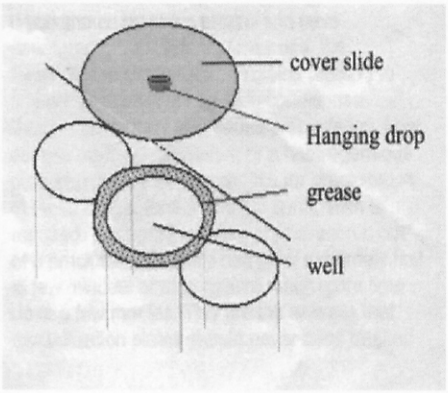
(3) นำ $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M หยดลงใน Tris-HCl 0.1 M จนกระทั่งพีเอชเท่ากับ 8.5

3.3.2 ขั้นตอนการตกผลึกโปรตีนในแบบกะ

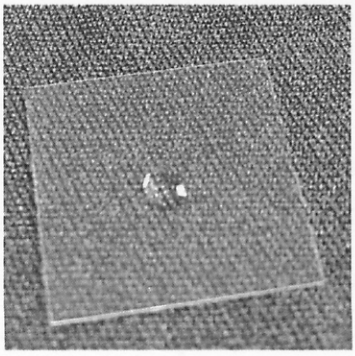
นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ เติมสาร Tris ในรูปของแข็ง 1.2114 กรัม ผสมกับสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ทำให้ได้ความเข้มข้นของ Tris เท่ากับ 0.1 M นำสารละลาย $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M ค่อยๆ หยดลงในบีกเกอร์สารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ด้วยอัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมทั้งกวนด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที (Cherdrungsi, 1999)



(1)



(2)



(3)

(4)

ภาพที่ 3-1 ภาพอธิบายการทำ Hanging drop : (1) ถาดขนาด 24 หลุม (24-Well plate), (2) แผนภาพอธิบาย, (3) หยดโปรตีนผสมกับหยดสารจากชุดทดสอบ และ (4) เสร็จสิ้นขั้นตอนการทำ Hanging drop

Figure 3-1 Hanging drop method: (1) 24-Well plate, (2) Setting an experiment, (3) A drop of protein mixed with precipitant and (4) Final step of hanging drop.

วัดพีเอชและสังเกตการเปลี่ยนแปลงความขุ่นที่เกิดขึ้นและเมื่อค่าพีเอชลดลงเหลือ 8.5 จึงหยุด จากนั้นตรวจสอบการเกิดผลึกโดยหยดสารละลายที่เตรียมได้ลงบนกระจกสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สำหรับชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนจากสารละลายโปรตีนตัวอย่างเป็นส่วนเพอมิเอทที่กรองผ่านอัลตราฟิลเตรชันในกระบวนการเดียวกับการทำให้เข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง

3.3.3 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลึก

นำสารละลายที่มีผลึกโปรตีนหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง (Juarez-Martinez *et al.*, 2001) และล้างผลึกด้วยสารละลายที่เตรียมจากข้อ 3.3.1 (3) โดยเติมสารละลายที่ใช้ล้างผลึกลงไปแล้วเขย่าจนเข้ากันและนำไปหมุนเหวี่ยงแยกผลึกออก จากนั้นกำจัดส่วนที่เป็นน้ำล้างทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนกระทั่งตรวจสอบไม่พบปริมาณโปรตีนในน้ำล้าง จากนั้นนำผลึกที่ล้างแล้วใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 2 วัน แล้วชั่งน้ำหนักจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ซึ่งเป็นน้ำหนักแห้งของผลึก

3.4 การวิเคราะห์ผลึกโปรตีน

ขั้นตอนการศึกษาการตกผลึกของโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิและการนำผลึกมาวิเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 3-2

3.4.1 ตรวจสอบผลึกโปรตีนโดยนำผลึกละลายน้ำและตรวจสอบด้วยวิธีไบยูเรท (Robyt, 1987) ซึ่งใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตราฐาน (ภาคผนวก 6)

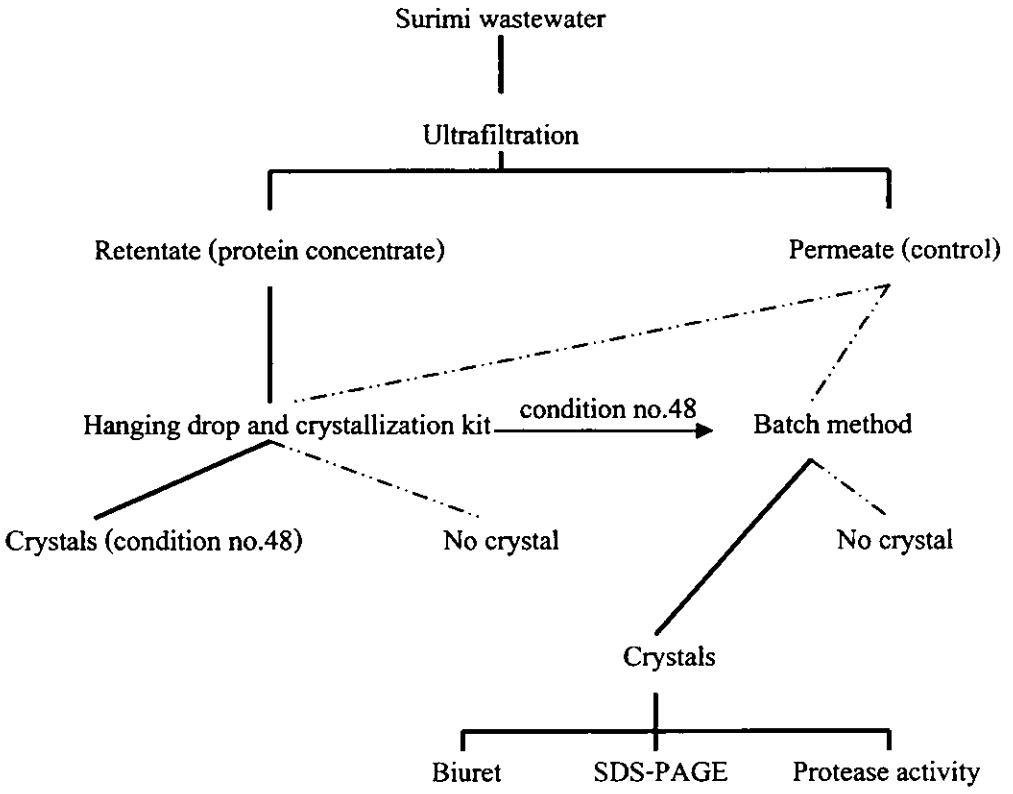
3.4.2 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE)

นำผลึกละลายน้ำเพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยดัดแปลงวิธีการของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก 7) ใช้ Stacking gel เท่ากับร้อยละ 3 และ Separating gel เท่ากับร้อยละ 12.5 ย้อมแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีนโดยใช้อิเล็กโตรโฟรีซีสชนิด SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนมาตรฐานชุด Broad range protein molecular weight markers ของบริษัท Promega ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 และ 225 kDa และหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye ที่ย้อมด้วยสีโบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue) แล้วนำมาคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility, R_f) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

$$\text{ค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye จากจุดเริ่มต้น}}$$

จากนั้นจึงนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด นำค่า R_f ของโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาพภาคผนวกที่ 3) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีน

3.4.3 ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของผลึก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 โดยดัดแปลงวิธีของ Hagihara และคณะ (1958) ดังแสดงในภาคผนวก 9



ภาพที่ 3-2 แผนผังการศึกษากระบวนการตกผลึกโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิ

Figure 3-2 Study of protein crystallization from surimi wastewater.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการตกผลึกของโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิมิด้วยเทคนิค Hanging drop

ทดสอบความสามารถในการตกผลึกของโปรตีนเข้มข้นโดยใช้ชุดทดสอบการตกผลึกของโปรตีนทางการค้า (Crystallization basic kit for protein ของบริษัท Sigma)

ผลจากการทดสอบการตกผลึกสารละลายโปรตีนเข้มข้น (Waste 4/ UF 300 kDa) ด้วยเทคนิค Hanging drop เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากประหยัด และสามารถทำในเครื่องมือขนาดเล็กและใช้สารเคมีปริมาณน้อย (Rayment, 2002) จึงเหมาะสำหรับการคัดเลือกสภาวะการตกผลึกของโปรตีน ในการทดลองใช้ชุดทดสอบการตกผลึกทางการค้ามีทั้งหมด 50 สภาวะ ดังตารางที่ 3-1 จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ปรากฏว่าเกิดความแตกต่างกันทั้งหมด 4 ลักษณะในหยดทดสอบ คือ (1) ไม่พบการเปลี่ยนแปลง (2) เกิดตะกอนขุ่น (3) เกิดลักษณะเป็นเจล (4) เกิดผลึก ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับที่ McPheson (2004) กล่าวว่าโปรตีนมีสถานะหลายรูปแบบ คือ ตะกอน เจล และผลึก โดยตะกอนและเจลเป็นผลมาจากการตกตะกอนหรือการเสียสภาพของโปรตีน แต่การศึกษาครั้งนี้ผลการทดลองส่วนใหญ่เกิดเป็นตะกอนขุ่น มีเพียงสภาวะเดียวที่สามารถเกิดเป็นผลึกได้โดยใช้เวลา 1 วัน คือสภาวะที่ 48 ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5), $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ 3 ประกอบด้วย $NH_4H_2PO_4$ 0.4 M ซึ่งเป็นเกลือชนิดเดียวกันแต่มีความเข้มข้นต่างกัน กลับพบว่าไม่เกิดผลึกแต่เป็นเจลแทน เพราะสารละลายเกลือ $NH_4H_2PO_4$ มีค่าพีเอชต่ำและไม่มีการเติมบัฟเฟอร์ช่วยรักษาค่าพีเอชจึงทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่วนสภาวะที่ 4 ประกอบด้วย Tris-HCl (pH8.5) 0.1 M, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 M เป็นสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและค่าพีเอชเท่ากันกับสภาวะที่ 48 แต่ไม่เกิดผลึกกลับเกิดเป็นเจลอีกเช่นกันเนื่องจากใช้เกลือต่างชนิดกัน คือสภาวะที่ 4 ใช้เกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ส่วนสภาวะที่ 48 ใช้เกลือ $NH_4H_2PO_4$ อธิบายได้จากรายงานของ Mullin (1992) กล่าวว่าที่อุณหภูมิเดียวกันเกลือต่างชนิดกันมีค่าการละลายไม่เท่ากัน เช่นที่ 30 องศาเซลเซียส $(NH_4)_2SO_4$ ละลายได้ 78%w/v ในขณะที่ $NH_4H_2PO_4$ ละลายได้ 45.8%w/v ถึงแม้ว่าจากชุดทดสอบจะใช้เกลือทั้ง 2 ชนิดมีความเข้มข้นเท่ากันแต่ $NH_4H_2PO_4$ มีความเข้มข้นใกล้จุดอิ่มตัวมากกว่าเพราะมีความสามารถในการละลายต่ำกว่า $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้การใช้เกลือ $NH_4H_2PO_4$ เป็นสารช่วยตกผลึกไม่เป็นการเพิ่มปริมาณน้ำในสารละลายโปรตีนตัวอย่างซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนลดลง จึงส่งผลให้สภาวะที่ 48 มีโอกาสตกผลึกได้มากกว่าสภาวะที่ 4 ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้มีผลต่อการตกผลึกของโปรตีน (Mirarefi and Zukoski, 2004)

ตารางที่ 3-1 ผลการทดสอบการตกผลึกโปรตีนจากชุดทดสอบทางการค้า

Table 3-1 Proteins observation in crystallization basic kit for protein.

Reagent composition	Result
1. Ca-chloride 0.02M, Na-acetate (pH4.6) 0.1M, 2-Methyl-2-4-pentanediol 30%	2
2. K-,Na-tartate 0.4M	2
3. NH_4-dihydrogenphosphate 0.4M	3
4. TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, NH_4-sulfate 2.0M	3
5. Na-citrate 0.2M, HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, 2-Methyl-2-4-pentanediol 30%	3
6. Mg-chloride 0.2M, TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, PEG 4000 30%	2
7. Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, Na-acetate 1.4M	3
8. Na-citrate 0.2M, Na- Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, 2-Propanol 30%	3
9. NH_4-acetate 0.2M, Na-citrate (pH5.6) 0.1M, PEG 4000 30%	2
10. NH_4-acetate 0.2M, Na-acetate (pH4.6) 0.1M, PEG 4000 30%	2
11. Na-citrate (pH5.6) 0.1M, NH_4-dihydrogenphosphate 0.4M	2
12. Mg-chloride 0.2M, HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, 2-Propanol 30%	3
13. Na-citrate 0.2M, TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, PEG 400 30%	2
14. Ca-chloride 0.02M, HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, PEG 400 28%	1
15. NH_4-sulfate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, PEG 8000 30%	3
16. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, Li-sulfate 1.5M	3
17. Li-sulfate 2.0M, TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, PEG 4000 30%	3
18. Mg-acetate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, PEG 8000 20%	2
19. NH_4-acetate 0.2M, TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, 2-Propanol 30%	2
20. NH_4-sulfate 0.2M, Na-acetate (pH4.6) 0.1M, PEG 4000 25%	2
21. Mg-acetate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, 2-Methyl-2-4-pentanediol 30%	2
22. Na-acetate 0.2M, TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, PEG 4000 30%	2
23. Mg-chloride 0.2M, HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, PEG 400 30%	2
24. Ca-chloride 0.02M, Na-acetate (pH4.6) 0.1M, 2-Propanol 20%	2
25. Imidazole (pH6.5) 0.1M, Na-acetate 1M	2

Result: 1. Solution is clear 2. Precipitate 3. Gelatinous protein precipitate 4. Crystals

ตารางที่ 3-1 ผลการทดสอบการตกผลึกโปรตีนจากชุดทดสอบทางการค้า (ต่อ)

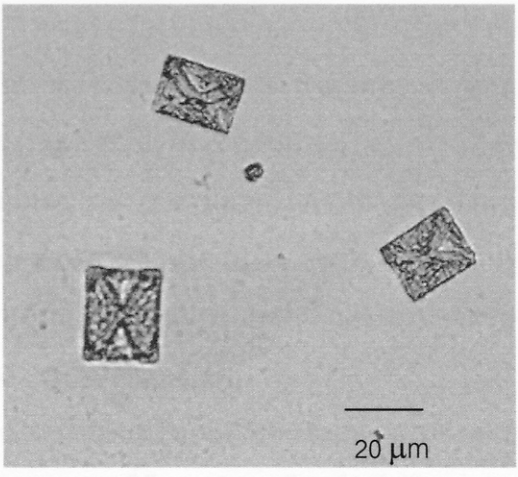
Table 3-1 Proteins observation in crystallization basic kit for protein (continue).

Reagent composition	Result
26. NH_4-acetate 0.2M, Na-citrate (pH5.6) 0.1M, 2-Methyl-2-4-pentanediol 30%	2
27. Na-citrate 0.2M, HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, 2-Propanol 20%	3
28. Na-acetate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, PEG 8000 30%	2
29. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, K-,Na-tartate 0.8M	1
30. NH_4-sulfate 0.2M, PEG 8000 30%	2
31. NH_4-sulfate 0.2M, PEG 4000 30%	2
32. NH_4-sulfate 2M	2
33. Na-formiate 4M	2
34. Na-acetate (pH4.6) 0.1M, Na-formiate 2M	2
35. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, K-dihydrogenphosphate 0.8M, Na-dihydrogenphosphate 0.8M	2
36. TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, PEG 8000 8%	2
37. Na-acetate (pH4.6) 0.1M, PEG 4000 8%	2
38. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, Na-citrate 1.4M	2
39. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, PEG 400 2%	2
40. Na-citrate (pH5.6) 0.1M, 2-Propanol 20%, PEG 4000 20%	2
41. HEPES Na-salt (pH7.5) 0.1M, 2-Propanol 10%, PEG 4000 20%	2
42. K-dihydrogenphosphate 0.05M, PEG 8000 20%	2
43. PEG 1500 30%	2
44. Mg-formiate 0.2M	3
45. Zn-acetate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, PEG 8000 18%	2
46. Ca-acetate 0.2M, Na-cacodylate (pH6.5) 0.1M, PEG 8000 18%	2
47. Na-acetate (pH4.6) 0.1M, NH_4-sulfate 2.0M	2
48. TRIS-HCl (pH8.5) 0.1M, NH_4-dihydrogenphosphate 2.0M	4
49. Li-sulfate 1.0M, PEG 8000 2%	2
50. Li-sulfate 1.0M, PEG 8000 15%	2

Result: 1. Solution is clear 2. Precipitate 3. Gelatinous protein precipitate 4. Crystals

การทำให้โปรตีนตกผลึกขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ดังที่ Juarez-Martinez และคณะ (2001) กล่าวว่า การส่งเสริมให้โปรตีนอยู่ในสภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดซึ่งต่างจากสภาวะสมดุลมาก เป็นการยาก ต้องอาศัยสมบัติทั้งด้านกายภาพและทางเคมี คือ พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของโปรตีน เป็นต้น และ Lee และคณะ (2000) กล่าวว่า สภาวะการตกผลึกสามารถควบคุมได้โดยปัจจัยหลายอย่าง เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้น และชนิดของสารช่วยตกผลึกอันได้แก่ เกลือหรือตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น จากปัจจัยหลายด้านดังที่กล่าวมาจึงเป็นการยากในการกำหนดสภาวะการตกผลึกของโปรตีน ดังนั้นชุดทดสอบการตกผลึกโปรตีนทางการค้าจึงสามารถช่วยกำหนดสภาวะได้ง่ายขึ้น

ผลึกดังภาพที่ 3-3 มีลักษณะทรงพีระมิดฐานสี่เหลี่ยม ซึ่งได้จากสารละลายโปรตีนเข้มข้นเตรียมจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิพบในชุดทดสอบการตกผลึกสภาวะที่ 48 โดยเทคนิค Hanging drop เป็นผลจากสารทดสอบการตกผลึกที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5), $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M เมื่อหยดรวมกับสารละลายโปรตีนบนกระจกสไลด์ทำให้น้ำที่มีอยู่ในสารละลายโปรตีนไปจับตัวกับเกลือเป็นผลให้สารละลายโปรตีนมีความเข้มข้นสูงขึ้นจนใกล้ถึงจุดอิ่มตัว เนื่องจากความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลงภายใต้ปรากฏการณ์ Salting-out (Papanikolau *et al.*, 2000) และการนำหยดสารละลายบนกระจกสไลด์ไปปิดคว่ำลอยเหนือบนหลุมที่บรรจุสารละลายชนิดเดียวกับที่หยดรวมกับสารละลายโปรตีน ภายใต้ระบบปิด จึงทำให้เกิดการระเหยและแพร่ของน้ำในหยดสารละลายผสมที่อยู่บนกระจกสไลด์สู่สารทดสอบการตกผลึกที่บรรจุในหลุม กระทั่งความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึงขั้นอิ่มตัวยิ่งยวด จึงทำให้โปรตีนสามารถตกผลึกออกมาเพื่อให้สารละลายโปรตีนเข้าสู่สมดุลการละลาย (Mueller *et al.*, 2001)



ภาพที่ 3-3 ผลึกที่เกิดจากชุดทดสอบการตกผลึกโปรตีนทางการค้าด้วยเทคนิค Hanging drop

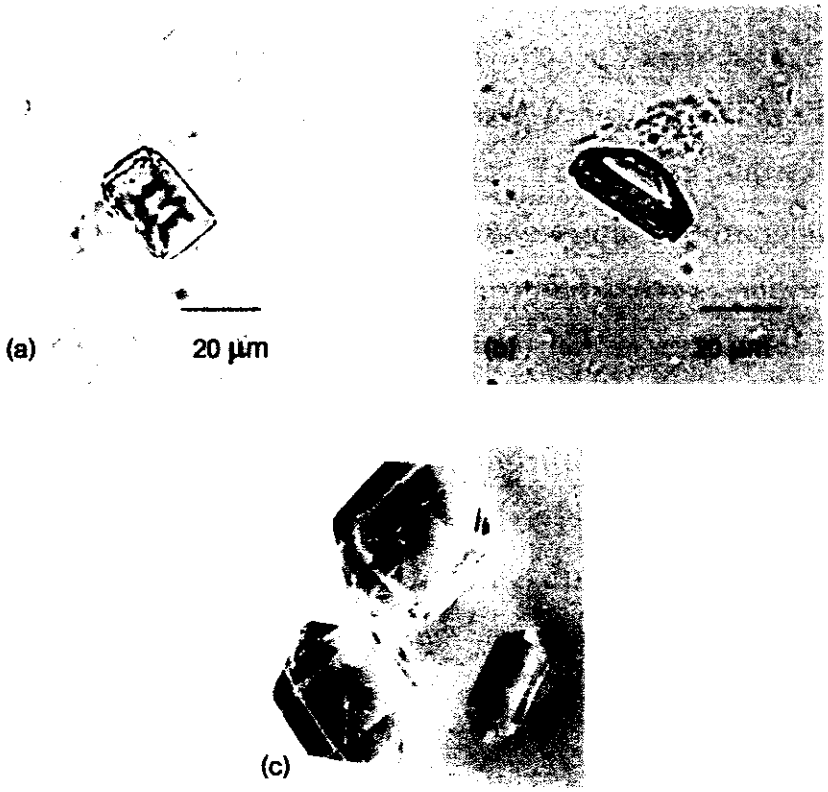
Figure 3-3 Photo of crystals formed in hanging drop by crystallization basic kit for protein.

2 การตกผลึกของโปรตีนเข้มข้นในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตชูริมิในการผลิตแบบกะ

การเตรียมสารตามชุดทดสอบการตกผลึกทางการค้าในสภาวะที่ 48 คือ Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5), $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M ไม่สามารถเตรียมได้โดยให้สารละลายประกอบด้วยทั้ง Tris 0.1 M และ $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M เนื่องจาก $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M มีค่าพีเอช 4.0 และหลังจากเติม Tris 0.1 M พีเอชเปลี่ยนไปเป็น 4.5 ซึ่งต่างจากค่าพีเอชตามชุดทดสอบการตกผลึกมาก (pH 8.5) โดย Berry (1995) กล่าวว่า NH_4^+ มักแตกตัวให้ H^+ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 ทำให้ยากต่อการใช้เกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ในสภาวะที่พีเอชสูงเนื่องจากจะทำให้ค่าพีเอชไม่คงตัว ซึ่งการนำสารละลายที่เตรียมจาก Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5) และ $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M มีค่าพีเอช 4.5 ไปทดสอบการตกผลึกโดยวิธี Hanging drop พบว่าไม่เกิดตกผลึกโปรตีนขึ้นแต่เกิดตะกอนแทนแสดงว่าพีเอช 4.5 ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพขึ้น

จากการทดลองพบว่าสามารถขยายขนาดการตกผลึกโปรตีนได้โดยการเติมสาร Tris ในรูปของแข็งลงในสารละลายโปรตีนเข้มข้นทีละน้อย เพื่อจะได้ไม่ทำให้สารละลายโปรตีนเจือจางลงและเกิดการเสียสภาพของโปรตีน เมื่อความเข้มข้นของ Tris เท่ากับ 0.1 M วัดพีเอชได้ประมาณ 10.5 หลังจากนั้นค่อยๆ หยดสารละลาย $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M ลงในน้ำตัวอย่างข้างต้น สังเกตพบว่าเมื่อพีเอชลดลงเหลือ 8.5 น้ำตัวอย่างมีลักษณะขุ่นขาวอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเท่ากับค่าพีเอชของสภาวะที่ 48 ในชุดทดสอบการตกผลึก และจากการนำไปตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์พบว่าสีขาวขุ่นนั่นคือผลึกที่มีขนาดเล็ก (ภาพรูปที่ 3-4) ซึ่งมีรูปร่างเหมือนกับผลึกที่เกิดจากชุดทดสอบการตกผลึกสภาวะที่ 48 ทำนองเดียวกับการทดลองของ Cherdrungsi (1999) ซึ่งสามารถสังเกตผลึกที่เกิดขึ้นได้ทันทีเมื่อเติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปในโปรตีนเข้มข้นอย่างช้าๆ จนถึงสภาวะที่เหมาะสมจะพบว่าสีของสารละลายโปรตีนเข้มข้นเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือสีเทา ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นไม่ใช่ผลึกของเกลือ $NH_4H_2PO_4$ อย่างแน่นอนเนื่องจากรูปร่างของผลึกแตกต่างกันและจากการยืนยันในการทดลองชุดควบคุมที่นำส่วนเพอมิเอทซึ่งได้จากการกรองน้ำตัวอย่างมาทดลองวิธีเดียวกันพบว่าไม่สามารถเกิดผลึก โดยการที่สารละลายโปรตีนเปลี่ยนมาอยู่ในรูปผลึกสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนดังนี้ ก่อนทำการทดลองตกผลึกพบว่ามี 22.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหลังจากเติมสารช่วยตกผลึกจนเกิดลักษณะขุ่นขาวแล้วนำส่วนสารละลายไปวัดปริมาณโปรตีนทันที พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในการละลายลดลงเหลือ 18.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การลดลงของปริมาณโปรตีนเกิดขึ้นเนื่องจาก 3 สาเหตุด้วยกัน คือ

(1) การเติมสารละลายเกลืออิ่มตัวเข้มข้นลงในการทดลองเปรียบเป็นการเจือจางสารละลายโปรตีน โดยในการทดลองนี้มีสารละลายโปรตีนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากเติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปปริมาตรจึงเพิ่มขึ้นเป็น 112 ml ความเข้มข้นของโปรตีนจึงควรลดลงเหลือ 20.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (คำนวณจากสมการ 100 ml x 22.47 mg/ml = 112 ml x C mg/ml)



ภาพที่ 3-4 ผลึกโปรตีนจากการทดลองแบบกะ เปรียบเทียบกับผลึกเกลือ $NH_4H_2PO_4$: (a) และ (b) เป็นผลึกโปรตีนที่ได้จากการทดลองแบบกะ ซึ่งเป็นผลึกเดียวกันแต่ถ่ายภาพในด้านที่ต่างกัน และ (c) ผลึกของเกลือ $NH_4H_2PO_4$

Figure 3-4 Protein crystals found in bulk crystallization compare with $NH_4H_2PO_4$: (a) and (b) Same crystal protein different view and (c) Crystals of $NH_4H_2PO_4$

(2) ความเข้มข้นโปรตีนหลังจากเติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปควรลดลงเหลือ 20.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จากการทดลองเหลือ 18.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉะนั้นปริมาณโปรตีนที่ละลายได้หายไป 1.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (20.06 – 18.48 = 1.58) เนื่องจากสาเหตุที่ปริมาณส่วนหนึ่งของโปรตีนเปลี่ยนไปเป็นผลึก

(3) โปรตีนเปลี่ยนไปเป็นผลึกควรมีปริมาณ 1.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองนำผลึกที่แยกได้ไปชั่งน้ำหนักแห้งได้เพียง 0.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนคงยังหายไป 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1.58 - 0.95 = 0.63) ซึ่งเกิดจากมีโปรตีนบางส่วนสูญเสียไปในขั้นตอนการล้างผลึก และบางส่วนเกิดเป็นตกตะกอนเนื่องจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิมีโปรตีนรวมอยู่หลายชนิดซึ่งมีสมบัติแตกต่างกัน จากสภาวะทำการทดลองตกผลึกโปรตีนบางชนิดอาจเสียสภาพกลายเป็นตะกอนแต่สามารถแยกตะกอนออกได้ด้วยการหมุนเหวี่ยง ซึ่งตะกอนจะแยกชั้นออกจากผลึกอย่างชัดเจนเนื่องจากมีค่าความหนาแน่นที่แตกต่างกัน

สำหรับผลของการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิโดยวิธีการตกผลึกแสดงดังตารางที่ 3-2 จะเห็นได้ว่าในน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงาน 5 ลิตร สามารถเก็บเกี่ยวเป็นผลึกได้ 0.4 กรัม ในกรณีเช่นนี้สามารถคำนวณกลับไปได้ว่า ถ้าหากโรงงานมีขนาดผลิตซูริมิ 1 ตันต่อวัน จะมีปริมาณน้ำทิ้งวันละ 27,000 ลิตร (27 ลูกบาศก์เมตร) ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลึกโปรตีนได้กลับวันละ 2,160 กรัม (2.16 กิโลกรัม)

ตารางที่ 3-2 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิโดยวิธีการตกผลึก

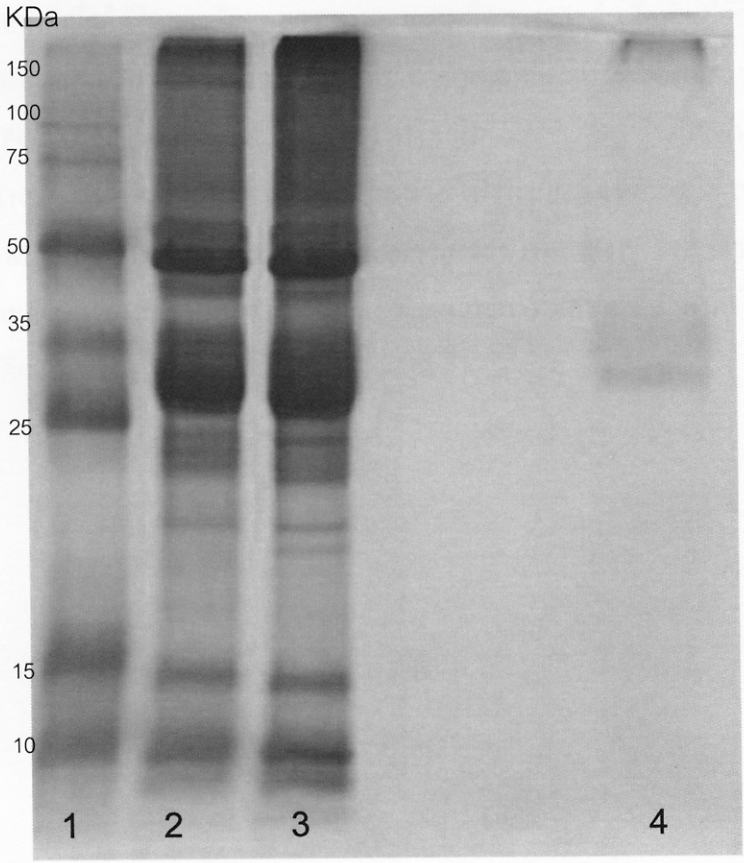
Table 3-2 Protein during recovery from surimi wastewater by crystallization.

Process	Protein concentration (mg/ml)	Volume
Surimi wastewater	5.87	5000 ml
Ultrafiltration	24.90	500 ml
Centrifuge	22.47	450 ml
Crystallization	-	0.4 g

3. การวิเคราะห์ผลึกโปรตีน

นำผลึกที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่าเป็นโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรทและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE)

เมื่อนำผลึกที่ได้จากการทดลองมาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (ภาพที่ 3-5) แถวที่ 1 คือ สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด Broad range protein molecular weight markers แถวที่ 2 คือ สารละลายโปรตีนเข้มข้นก่อนตกผลึก แถวที่ 3 คือ สารละลายโปรตีนหลังจากตกผลึกแล้ว แถวที่ 4 คือ ผลึกโปรตีน พบว่าผลึกโปรตีนจากน้ำทิ้งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25-35 kDa เมื่อเทียบเคียงกับรายงานของ Mireles Dewitt and Morrissey (2002) กล่าวว่าในน้ำล้างเนื้อปลาบดจากกระบวนการผลิตซูริมีมีเอนไซม์โปรติเอสอยู่และมวลโมเลกุลขนาด 28.8 kDa ซึ่งขนาดใกล้เคียงกับผลึกโปรตีนในการทดลองครั้งนี้ จึงเป็นแนวคิดให้นำผลึกมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้สารละลายเคซีนเป็นซับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 นาน 15 นาที ผลปรากฏว่าไม่สามารถย่อยเคซีนได้ แต่จากรายงานของ Benjakul และคณะ (2003) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปลาตาหวาน สามารถให้กิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 7 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมต่ำ ดังนั้นการวิเคราะห์ผลึกโปรตีนจากการทดลองครั้งนี้อาจทำการทดลองที่สภาวะซึ่งไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีในปลาตาหวาน จึงไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส แต่ถ้าหากกำหนดสภาวะที่เหมาะสม และใช้สารละลายโปรตีนที่เตรียมจากผลึกที่ได้ในปริมาณที่เข้มข้นกว่านี้ อาจสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ดีผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าผลึกโปรตีนที่ได้น่าจะเป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิก เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ตกผลึกเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ โดย Lin และคณะ (1995) กล่าวว่า น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิส่วนมากมีโปรตีน 2 กลุ่ม คือ โปรตีนขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุล 205 kDa คือ ไมโอซิน และโปรตีนขนาด 29–45 kDa ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิก



ภาพที่ 3-5 SDS-PAGE ของผลึกโปรตีนที่ได้จากน้ำทิ้งในขั้นตอนการบีบน้ำส่วนเกินออกจากกระบวนการผลิตซูริมิ : (1) โปรตีนมาตรฐาน, (2) สารละลายโปรตีนเข้มข้น, (3) สารละลายโปรตีนหลังตกผลึก และ (4) ผลึกโปรตีน

Figure 3-5 SDS-PAGE pattern of crystal from surimi wastewater : (1) Standard proteins, (2) Concentrated protein, (3) Mother liqour and (4) Crystal protein

สรุปผลการทดลอง

โปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชันสามารถตกผลึกได้โดยอาศัยชุดทดสอบการตกผลึกทางการค้าเพื่อคัดเลือกสภาวะเบื้องต้นร่วมกับเทคนิค Hanging drop จากการศึกษาพบว่าสามารถเกิดผลึกโปรตีนที่สภาวะ Tris-HCl 0.1M (pH 8.5), $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M จึงนำสภาวะดังกล่าวมาประยุกต์เพื่อการตกผลึกแบบกะ พบว่าสามารถทำได้โดยเติม Tris ในรูปของแข็งลงในสารละลายโปรตีนเข้มข้น และใช้สารละลายเกลือ $NH_4H_2PO_4$ 2.0 M ค่อยๆ เติมในสารละลายโปรตีนจนกระทั่งพีเอช 8.5 จึงสามารถทำให้โปรตีนเกิดผลึกในสารละลายได้จากปรากฏการณ์ Salting-out และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของผลึกพบว่าอยู่ในช่วงเดียวกับโปรตีนซาร์โคพลาสมิก

เอกสารอ้างอิง

เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2541. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์. ใน เทคโนโลยีชีวภาพ. หน้า 168-203. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

Asherie, N. 2004. Protein crystallization and phase diagrams. Methods. 34 : 266-272.

Belter, P. A., Cussler, E. L. and Hu, W. S. 1988. Bioseparations: Downstream processing for biotechnology. John Wiley & Sons. United States of America.

Benjakul, S., Visessanguan, W. and Leelapongwattana, K. 2003. Purification and characterization of heat-stable alkaline protinase from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. Comp. Biochem. Physiol. 134 : 579-591.

Berry, M. B. 1995. Protein Crystallization: Theory and Practice. สืบค้นจาก : http://www-bioc.rice.edu/~berry/paper/crystallization/crystallization.html (4 มกราคม 2545)

Bonnete, F., Vivares, D., Robert, C. and Colloc'h, N. 2001. Interaction in solution and crystallization of *Aspergillus flavus* urate oxidase. J. Cryst. Growth. 232 : 330-339.

Chayen, N. E. 1999. Recent advances in methodology for the crystallization of biological macromolecules. J. Cryst. Growth. 198 : 649-655.

Chayen, N. E. 2005. Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization. Prog. Biophys. Mol. Biol. 88 : 329-337.

Cherdrungsi, K. 1999. Bulk Crystallization of Lysozyme. Ph.D. Dissertation. University of Qeensland.

Dale, G. E., Oefner, C. and D'Arcy, A. 2003. The protein as a variable in protein crystallization. J. Struct. Biol. 142 : 88-97.

DeLucas, L. J., Hamrick, D., Cosenza, L., Nagy, L., McCombs, D., Bray, T., Chait, A., Stoops, B., Belgovskiy, A., Wilson, W. W., Parham, M. and Chernov, N. 2005. Protein crystallization: virtual screening and optimization. Prog. Biophys. Mol. Biol. 88 : 285-309.

Dwyer, J. L. 1993. Process Purification. *In* Protein Biotechnology: Isolation, Characterization and Stabilization. (Franks, F. ed) p.533-571. Humana. United States of America.

Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M. and Okunuki, K. 1958. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline protease of *B. subtilis*. Biochem. J. (Tokyo) 45 : 185-194.

Kierzek, A. M. and Zielenkiewicz, P. 2001. Models of protein crystal growth. Biophys. Chem. 91 : 1-20.

Jacobsen, C., Garside, J. and Hoare, M. 1998. Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. Biotechnol Bioeng. 57(6) : 666-674.

Juarez-Martinez, G., Garza, C., Castillo, R. and Moreno, A. 2001. A dynamic light scattering investigation of the nucleation and growth of thaumatin crystals. J. Cryst. Growth. 232 : 119-131.

Judge, R. A., Johns, M. R. and White, E. T. 1995. Protein purification by bulk crystallization : The Recovery of ovalbumin. Biotechnol. Bioeng. 48 : 316 – 323.

Judge, R. A., Forsythe,E. L. and Pusey, M. L. 1998. The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth. Biotechnol. Bioeng. 59(6) : 776 – 785.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head bacteriophage T4. Nature. 277 : 680–685.

Lee, T. S., Vaghjian, J. D., Lye, G. J. and Turner, M. K. 2000. A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. Enzyme Microb Technol. 26 : 582-592.

Lin, T. M., Park, J. W. and Morrissey, M. T. 1995. Recovery proteins and reconditioned water from surimi processing waste. J. Food Sci. 60(1) : 4–9.

Luft, J. R., Wolfley, J., Jurisica, I., Glasgow, J., Fortier, S. and DeTitta, G. T. 2001. Macromolecular crystallization in a high throughput laboratory-the search phase. J. Cryst. Growth. 232 : 591-595.

McPherson, A. 1982. Preparation and Analysis of Protein Crystals. John Wiley & Sons. United States of America.

McPherson, A. 2004. Introduction to protein crystallization. Methods. 34 : 254-265.

Mireles Dewitt, C. A. and Morrissey, M. T. 2002. Parameter for the recovery of proteases from surimi wash water. Bioresour. Technol. 81 : 241 –247.

Mirarefi, A. Y. and Zukoski, C. F. 2004. Gradient diffusion and protein solubility: use of dynamic light scattering to localize cyrstallization condition. J. Cryst. Growth. 265 : 274-283.

Mueller, U., Nyarsik, L., Horn, M., Rauth, H., Przewieslik, T., Saenger, W., Lehrach, H. and Eickhoff, H. 2001. Development of technology for automation and miniaturization of protein crystallization. J. Biotechnol. 85 : 7 – 14.

Mullin, J. W. 1992. Crystallization. 3rd Ed. Butterworth-Heinemann. Oxford.

Papanikolau, Y., Gessmann,R., Petratos, K. Igarashi, K. and Kokkinidis, M. 2000. Crystallization of the *E. coli* polyamine-induced protein: a novel procedure based on the concept of ionic strength reducers. J. Cryst. Growth. 210 : 761-766.

Rayment, I. 2002. Small-scale batch crystallization of protein revisited: an underutilized way to grow large protein crystal. Structure. 10 : 147-151.

Robyt, J. F and Bernard, J. W. 1987. Biochemical Techniques Theory and Practice. Brooks/Cole. California.

Sauter, C., NG, J. D., Lorber, B., Keith, G., Brion, P., Hosseini, M. W., Lehn, J. and Giege, R. 1999. Additives for the crystallization of proteins and nucleic acids. J. Cryst. Growth. 196 : 365-376.

Schwartz, A. M. and Berglund, K. A. 2000. In situ monotoring and control of lysozyme concentration during crystallization in hang drop. J. Cryst. Growth.210 : 753-760.

Scopes, R. K. 1987. Protein Purification: Principles and Practice . 2nd ed. Springer-Verlag. United States of America.

Sheehan, D., O'Mahony, C. and Coll, M. 1998. A modification of the hanging drop method of protein crystallization suitable for an undergraduate class practical. Biochem. Edu. 26 : 173-175.

Shenoy, B., Wang, Y., Shan, W. and Margolin, A. L. 2001. Stability of crystalline proteins. Biotechnol. Bioeng. 73(5) : 358 – 368.