



## การแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ

### Purification and Characterization of G-type Lysozyme from Ostrich Egg White

มลฤดี กงชัยภูมิ<sup>1</sup> ดาราพร เชื้ออ่อน<sup>1</sup> ปรียานันท์ อันวินเศ<sup>2</sup> นิสาชล แจ้งพรมมา<sup>2,3</sup> และ สมปอง คล้ายหนองสรวง<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>3</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บูรณาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Monruedee Konkchaiyaphum<sup>1</sup> Daraporn Chua-on<sup>1</sup> Preeyanan Anwised<sup>2</sup> Nisachon Jangpromma<sup>2,3</sup>  
and Sompong Klaynongsruang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang Khon Kaen, Khon Kaen, 40002 Thailand

<sup>2</sup>Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes, Khon Kaen University, Muang Khon Kaen,  
Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>3</sup>Department of Integrated Science, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang Khon Kaen, Khon Kaen, 40002 Thailand

\*Corresponding Author, E-mail: somkly@kku.ac.th

Received: 8 September 2020 | Revised: 15 September 2020 | Accepted: 22 September 2020

#### บทคัดย่อ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ (Ostrich egg white lysozyme; OEWL) โดยการตกตะกอนโปรตีนชนิดอื่นออกด้วยคุณสมบัติของค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีน และนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วย CM-Toyopearl 650M cation-exchange chromatography ร่วมกับ Sephadex-G75 gel filtration ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์เป็นไลโซไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ทำการยับยั้งกิจกรรมการทำงาน (activity) ของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ด้วยเทคนิค refolding gel ผลการทดลองแสดงโซนใส (clear zone) ที่โปรตีนขนาด 21 kDa สามารถยับยั้งได้ว่า เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นเป็นไลโซไซม์ ซึ่งสามารถย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียที่เป็นซีสเตรตได้ จากการวิเคราะห์ค่า isoelectric point (pI) ด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบว่า OEWL มีค่า pI ประมาณ 9.95 เมื่อทำการศึกษา pH (optimum pH) และอุณหภูมิ (optimum temperature) ที่เหมาะสมในการทำงานของ OEWL พบว่า OEWL มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน 2 ค่า คือ pH 4 และ 7 และพบอุณหภูมิ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ OEWL จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศที่ทำบริสุทธิ์ได้ มีค่า specific activity สูงสุดที่ 60.23 unit/mg และมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ 1,680.30 unit จากผลการวิจัยทั้งหมดพบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศให้มีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศไป

ประยุกต์ใช้ในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ทางเลือกในการป้องกันการติดเชื้อ รวมถึงผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เช่น เจลแต้มสิว ได้ในอนาคต

### ABSTRACT

In this research, a G-type lysozyme from ostrich egg white (OEWL) was purified by pH precipitation (pH 4.0 and 7.0) and CM-Toyopearl 650M cation-exchange column chromatography followed by Sephadex-G75 gel filtration. The SDS-PAGE technique was used to assure the protein purity and the molecular weight. The results indicated that purified OEWL had a molecular weight of 21 kDa, confirming that the purified enzyme is lysozyme, which can digest the bacterial cell wall as a substrate. An analysis by 2D-PAGE revealed that OEWL had an isoelectric point (pI) of 9.95. Then, the OEWL was further characterized in terms of optimum pH and temperature. The OEWL showed a broad range of optimum pH at 4 and 7, while the optimal temperature was 30 °C. Based on preliminary results, it was found that the purified G-type lysozyme from ostrich egg white exhibited a maximum specific activity of 60.23 unit/mg and showed the enzyme activity value of 1680.30 unit. Regarding these results, these OEWL revealed the potential for application and development as alternative products in preventing bacterial infection. It also exhibited the compatibility to be utilized in cosmetic products such as anti-acne gel in the future.

**คำสำคัญ:** ไลโซไซม์ ไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ การแยกบริสุทธิ์

**Keywords:** Lysozyme, Ostrich Egg White, Purification

### บทนำ

ไข่เป็นแหล่งของโปรตีนสำคัญที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งโปรตีนหลักที่เป็นองค์ประกอบในไข่ขาว ได้แก่ โปรตีนโอวัลบูลมิน (ovalbumin; 54%) โอวัลทรานเฟอริน (ovotransferrin; 12%) โอวัลมิวคอยด์ (ovomuroid; 11%) โอวัลมิวซิน (ovomucin; 3.5%) และไลโซไซม์ (lysozyme; 3.5%) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีการศึกษาเพื่อการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้เชิงอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านการแพทย์ ด้านอาหาร เป็นต้น โดยพบว่าโปรตีนไลโซไซม์นั้นมีการศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอาหาร (food processing) ในแง่ของการใช้เป็นสารกันบูด (preservative) เนื่องจากมีคุณสมบัติหลักในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Abeyrathne et al., 2013) ไลโซไซม์ (EC 3.2.1.17) ถูกค้นพบในปี 1922 โดย Alexander Fleming เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ และพบได้ทั่วไปทั้งในของเหลวและเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายของคน พืช และสัตว์ เช่น น้ำตา น้ำนม สารคัดหลั่ง ไข่ขาว เป็นต้น โดยไลโซไซม์จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4-glycosidic linkages) ระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmuramic

acid (MurNAc) ซึ่งเป็นเฮทเทอร์โอฟอลิเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Vanderkelen et al., 2011; Kajla et al., 2010) จากข้อมูลการศึกษาพบว่าไลโซไซม์มีบทบาทสำคัญในระบบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งจะต่อต้านการบุกรุกจากแบคทีเรีย (Jolles and Jolles, 1984) นอกจากนี้คุณสมบัติการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียแล้ว ไลโซไซม์ยังมีคุณสมบัติของฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal) (Samaranayake et al., 2001) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (antiviral) (Hasselberger, 1978; Lee-Huang et al., 1999) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (antitumor) (Sava et al., 1988) ฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) (Jolles and Jolles, 1984) และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immune modulatory) (Kokoshis et al., 1978) โดยทั่วไปไลโซไซม์ถูกแบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลักจากความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน ได้แก่ 1) Chicken type lysozyme (C-type) 2) Goose-type lysozyme (G-type) 3) T4 phage lysozyme (T4-type) (Pooart et al., 2004) จากการศึกษาเชิงโครงสร้างพบว่าไลโซไซม์ ชนิด C-type, T4-type และ G-type มีลักษณะความเหมือน (similarity) ของ

โครงสร้างระดับปฐมภูมิ (primary structure) อย่างมาก และพบว่ามีข้อมูลการศึกษาหน้าที่ของไลโซไซม์ C-type และ T4-type อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของไลโซไซม์ชนิด G-type ยังมีข้อมูลอย่างจำกัด ไลโซไซม์ชนิด G (G-type lysozyme) ถูกพบเป็นครั้งแรกในปี 1967 โดย Canfield และ McMurry โครงสร้างระดับปฐมภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 185 residues (Canfield and McMurry, 1967) โดยพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น ไก่ ห่าน นก และปลา (Nakano and Graf, 1991; Simpson et al., 1980; Hikima et al., 1997) อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษา G-type lysozyme นั้นยังมีข้อมูลทางด้าน primary structure และ catalysis mechanism อย่างจำกัดและน้อยมาก (Simpson and Morgan, 1983; Hikima et al., 2001; Thammasirak et al., 2001; Zhao et al., 2007) โดยส่วนใหญ่พบการศึกษา G-type lysozyme จากปลา (Zhao et al., 2011; Buonocore et al., 2014) แต่การศึกษาในกลุ่มสัตว์ปีกยังมีข้อมูลที่น้อย โดยเฉพาะสัตว์ปีกขนาดใหญ่ เช่น นกกระทา ซึ่งมีความแตกต่างของโปรตีนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในไข่ขาวจำนวนมาก

นกกระทา (*Struthio camelus*) เป็นนกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา โดยธรรมชาติอาศัยในทุ่งหญ้า ป่าโปร่ง ค่อนข้างแห้งแล้ง การใช้ประโยชน์จากผลผลิตนกกระทาสามารถใช้ได้เกือบทุกส่วน เช่น เนื้อและไข่ใช้สำหรับบริโภค ซึ่งมีคลอเลสเตอรอลต่ำ หนึ่งไข่ทำเครื่องนึ่งและเครื่องใช้ เปลือกไข่และขนไข่ทำเครื่องประดับ ไชมันนำไปเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง เช่น สบู่ ยาสระผม ครีมนวดผิว เป็นต้น กระดูกเล็บเท้าและปากใช้ในสูตรเครื่องยาจีน (ศิริพันธ์, 2544; พัชรและจรัสรัตน์, 2545) ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงนกกระทาในระบบฟาร์มเพื่อการผลิตจำหน่ายมากขึ้น โดยการผลิตหลักจะเป็นการเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเนื้อ มีการนำเปลือกไข่ไปทำเครื่องประดับบางส่วน แต่การแปรรูปหรือสร้างผลิตภัณฑ์จากนกกระทาด้านอื่นๆ ยังมีน้อย (ศิริพันธ์, 2544; ไชวัฒน์, 2561) โดยเฉพาะไข่ของนกกระทาที่นอกจากการบริโภคเป็นอาหารแล้วยังไม่พบการนำไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่ามากนัก

ทั้งนี้ไข่ของสัตว์ปีกเป็นแหล่งโปรตีนสูง โดยเฉพาะในไข่ขาวมีโปรตีนสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง เช่น

ไลโซไซม์ โอวัลบูมิน โอวัลทรานสเฟอรัลลิน โอโวมิวคอยด์ และ โกลบูลิน เป็นต้น รวมถึงไขมัน เกลือแร่และวิตามิน (Miguel et al., 2005) ไข่ของนกกระทา 1 ฟองหนักประมาณ 0.9-1.5 Kg (เทียบเท่ากับไข่ไก่ 18-30 ฟอง) ไข่ในปริมาณที่เท่ากัน ไข่ของนกกระทามีปริมาณโปรตีนเทียบเท่ากับไข่ไก่ แต่ปริมาณโซเดียมต่ำกว่าไข่ไก่ จึงเหมาะสำหรับผู้ต้องการควบคุมโซเดียม นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบที่ใช้ไลโซไซม์จากไข่ขาวของนกกระทาในการทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือใช้ในการรักษาทางการแพทย์อีกด้วย (Homayouni-Tabrizi et al., 2015)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของนกกระทา โดยอาศัยหลักการแยกโปรตีนโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange chromatography) ร่วมกับ เจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography) จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลโซไซม์ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์และเพิ่มมูลค่าให้กับไข่ของนกกระทาต่อไปในอนาคต

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมตัวอย่างไข่ขาวและการตกตะกอนโปรตีน

นำไข่ของนกกระทามาแยกเอาเฉพาะไข่ขาว ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เสียงความถี่สูง (sonication) จากนั้นเจือจาง 3 เท่าด้วย 0.05 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 h แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 min เก็บสารละลายตัวอย่างไข่ขาวส่วนสารละลายด้านบน (supernatant) มาตกตะกอนด้วย 1.0 M HCl pH 4.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 min แล้วเก็บสารละลายด้านบนมาตกตะกอนอีกครั้งที่ pH 7.0 โดยใช้ 1.0 M NaOH จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 min แล้วเก็บส่วนสารละลายด้านบนเป็นโปรตีนเริ่มต้น (crude protein) เพื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อไป

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนใช้วิธีของ Bradford โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

(Bradford, 1976) การตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ทำได้โดยการวิเคราะห์ค่าความขุ่นของเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับไลโซไซม์ ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 (Shugar, 1952) โดยตรวจวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 nm ( $OD_{450}$ ) โดยหนึ่งหน่วย (unit) ของเอนไซม์ปริมาณ 1 ml เท่ากับการลดลง 0.1 unit ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ( $OD_{450}$ ) ในเวลา 1 min ที่อุณหภูมิ 25 °C

### 3. การแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation-exchange chromatography)

ทำการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยใช้เรซิน CM-Toyopearl 650M ชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange) คอลัมน์ขนาด 5 cm x 35 cm โดยทำการปรับสภาพคอลัมน์ (equilibrate column) ด้วย 0.05 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนไขขาวนกกระจอกเทศ (crude protein) เติมลงในคอลัมน์ ทำการชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงเป็นขั้นๆ (stepwise) ด้วย 0.2-0.5 M NaCl ใน 0.05 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min เก็บตัวอย่างส่วนละ (fraction) 5 ml นำสารละลายโปรตีนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ( $OD_{280}$ ) และตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ จากนั้นเก็บเฉพาะตัวอย่างส่วนที่แสดงกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ (pooled fraction) ทำการกำจัดเกลือด้วยวิธีไดอะลิซิส (dialysis) และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ด้วยการระเหยสารโดยใช้ระบบปั่นแยก (speed vac concentration)

### 4. การแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (Gel filtration chromatography)

นำตัวอย่างโปรตีนที่ตรวจพบกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี cation-exchange chromatography มาทำการแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค gel filtration (Sephadex G-75) ขนาดคอลัมน์ 2.5 cm x 85 cm โดยทำการปรับสภาพคอลัมน์ ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีน เติมลงในคอลัมน์ แล้วทำการชะโปรตีนด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่อัตราการไหล 0.3 ml/min จากนั้นเก็บตัวอย่างส่วนละ

3 ml นำมาตรวจสอบปริมาณในสารละลายโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ( $OD_{280}$ ) และตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ จากนั้นเก็บเฉพาะตัวอย่างส่วนที่แสดงกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ ทำการกำจัดเกลือด้วยวิธีไดอะลิซิสและทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ด้วยการระเหยสารโดยใช้ระบบปั่นแยก

### 5. การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การตรวจสอบขนาดของโปรตีนจะใช้ 13% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยการใช้ protein marker ที่มี phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa) โดยใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกที่ 150 V เป็นเวลา 40 min จากนั้นย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250

### 6. การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ด้วยวิธี Refolding gel electrophoresis

เตรียม 13 % polyacrylamide gel ที่มี *M. lysodeikticus* ผสมอยู่ 2% w/v จากนั้นผสมตัวอย่างโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้กับ solubilizing dye ซึ่งไม่มี  $\beta$ -mercapto-ethanol อัตราส่วน 1:1 แล้วทำการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นทำการล้างเอา SDS ออกด้วย 1% Triton X-100 ใน 10 mM Phosphate buffer pH 7.0 ติดตามผลโดยพิจารณาจากโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

### 7. การหาค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ของโปรตีนไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี 2-Dimension sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

นำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้มาทำการแยกโปรตีนในทิศทางแรกซึ่งโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยสมบัติที่แตกต่างกันของค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ของโปรตีน โดยจะทำการโหลดโปรตีนลงบน IPG strip ในช่วง pH 3-10 ขนาด 7 cm โดยทำการแยกโปรตีนด้วยเครื่อง Ettan® IPGphor (Amersham Biosciences) จากนั้นเติมสารละลายโปรตีน (100  $\mu$ g/strip) ที่

ทำการผสมกับ rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8% (w/v) IPG buffer and 0.2% bromophenol blue) เรียบร้อยแล้วลงใน strip holder จากนั้นวาง IPG strip ในช่วง pH 3-10 ขนาด 7 cm ลงทับสารผสมโปรตีน แล้วเติมสารละลาย strip cover fluid ปิดทับ IPG strip ประมาณ 700  $\mu$ l แล้ว run program โดยตั้งค่า program ดังนี้ rehydration time 12 h ขั้นแรก 500 V 30 min (250Vhr) ขั้นตอนที่สอง 1000 V 30 min (500Vhr) ขั้นตอนที่สาม 5000 V 100 min (8500Vhr) รวมเป็น 9250 Vhr เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม นำ IPG strip มาแยกต่อในทิศทางที่ 2 โดยอาศัยสมบัติของขนาดโมเลกุลที่ต่างกันของโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (13% SDS-PAGE) จากนั้นนำแผ่นเจลมาถ่ายภาพแล้วนำไปวิเคราะห์ Spot โปรตีนบนเจลด้วยโปรแกรม Image Master™ 2D Platinum

#### 8. การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH)

ตรวจหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์โดยการวัดกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ต่อเชื้อ *M. lysodeikticus* ใน Miller & Golder buffer pH 4 5 6 7 8 และ 9 โดยคำนวณหากิจกรรมการทำงานและคำนวณค่า Relative activity

#### 9. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature)

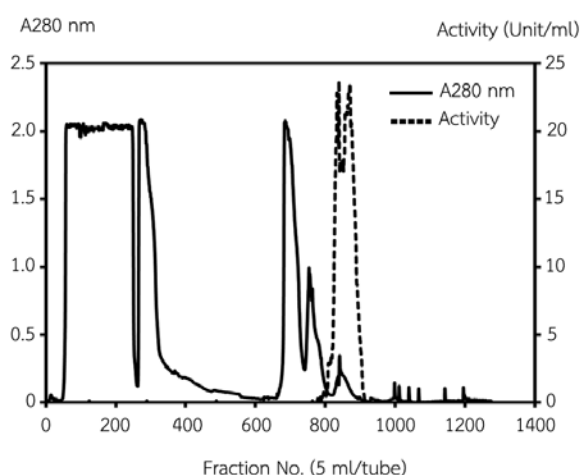
ตรวจหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์โดยการนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 และ 80 °C เป็นเวลา 10 min จากนั้นวัดกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ต่อเชื้อ *M. lysodeikticus* ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0

### ผลการวิจัย

#### 1. ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์

การแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาแยกสกัดด้วยขั้นตอนของการตกตะกอนโปรตีน ด้วยค่า pH และแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 ขั้นตอนคือ cation-exchange chromatography และ gel filtration chromatography ได้ผลดังรูปที่ 1 และ 2

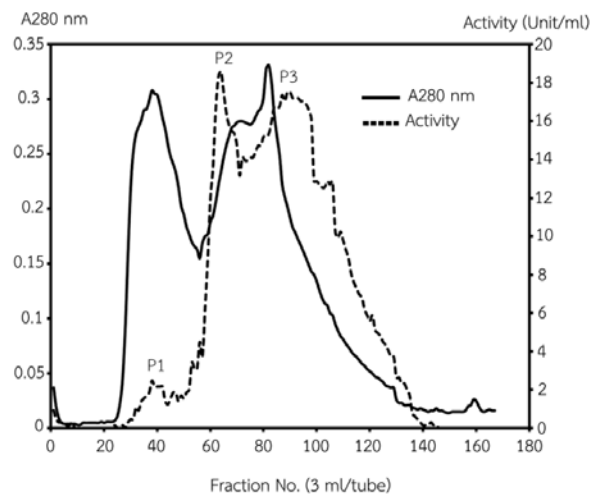
ผลการแยกบริสุทธิ์ของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาแยกสกัดด้วยวิธี cation-exchange chromatography พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกมาได้หลาย peak (รูปที่1) แต่เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์พบว่ามีเพียง peak เดียวที่มีกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ ซึ่งถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นของเกลือที่ประมาณ 0.2-0.3 M NaCl (รูปที่ 1) และเพื่อเป็นการทำให้โปรตีนไลโซไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และแยกออกจากกันได้ชัดเจน จึงได้ทำการรวมตัวอย่างหลอดที่ 800-900 ที่มีกิจกรรมการทำงานดังกล่าวมาทำการแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี gel filtration chromatography



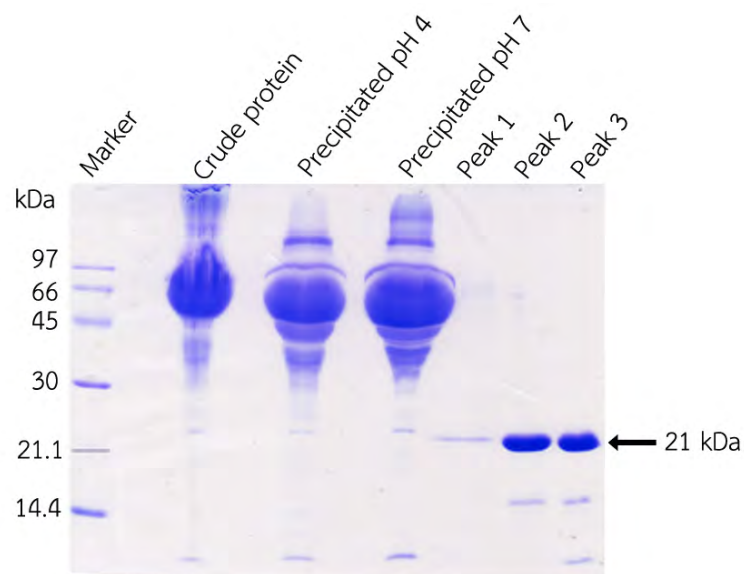
รูปที่ 1 ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาแยกสกัด ด้วย CM-Toyopearl 650M cation-exchange chromatography

หลังจากทำการแยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยวิธี gel filtration chromatography ผลการทำบริสุทธิ์ เอ็นไซม์พบ peak ของโปรตีนจำนวน 2 peak (รูปที่ 2) ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ และเมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์พบว่า มี 3 peak คือ peak ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 2) ซึ่งใน peak ที่ 2 และ 3 นั้นพบว่า มีกิจกรรมการทำงานสูงกว่า peak

ที่ 1 จากนั้นทำการเก็บเฉพาะตัวอย่างหลอดที่ 60-100 ซึ่งเป็นช่วง peak ที่มีกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์ พร้อมทั้งทำการกำจัดเกลือด้วยวิธีไดอะไลซิสและเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการระเหยสารโดยใช้ระบบปั่นแยก จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 2 ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศด้วย Sephadex G-75 gel filtration chromatography



รูปที่ 3 ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE (13% separating): lane 1: Protein marker; lane 2: crude protein; lane 3: precipitated pH 4; lane 4: precipitated pH 7; lane 5: peak 1; lane 6: peak 2; lane 7: peak 3

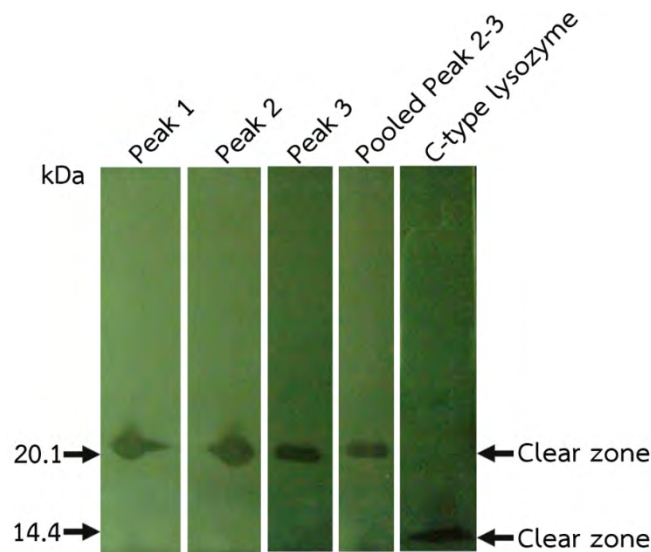
หลังจากนำตัวอย่างโปรตีนส่วน peak ที่ 1, 2 และ 3 ที่มีกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3) พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 21 kDa ทั้ง 3 peak และพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 21 kDa ปะปนมาด้วยเล็กน้อย ส่วนใน crude precipitated pH 4 และ precipitated pH 7 พบโปรตีนที่มี

น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังคงพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ในทุกขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ เมื่อทำ refolding gel electrophoresis เพื่อเป็นการยืนยันแถบโปรตีนไลโซไซม์ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับไลโซไซม์ชนิด C (C-type lysozyme) ซึ่งเป็น positive control ผลการตรวจสอบ พบว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ทั้ง peak 1, peak 2, peak 3 และโปรตีนที่อยู่ระหว่าง peak 2-3 (pooled peak 2-3) นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 21 kDa และปรากฏบริเวณโซนใส (clear zone) อย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับไลโซไซม์

ชนิด C ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.6 kDa (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้เป็นไลโซไซม์ชนิด G

จากการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทา พบว่า peak ที่ 1 2 และ 3 มีไลโซไซม์ 0.38 0.42 และ 0.31 mg/ml ตามลำดับ โดยไลโซไซม์ที่ได้จาก peak ที่ 3 มีความบริสุทธิ์สูงสุดคิดเป็น 14.62 เท่า และผลผลิตเอนไซม์ (yield) คิดเป็นร้อยละ 12.55 ของโปรตีนเริ่มต้น (crude enzyme) มี specific activity ที่ 60.23 unit/mg และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ 1680.30 unit (ตารางที่ 1)



**รูปที่ 4** ผลการยืนยันไลโซไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากไข่ขาวของไข่นกกระทา ด้วยวิธี Refolding gel electrophoresis (13% SDS-PAGE ที่ผสม *M. lysodeikticus* อยู่ 2% w/v), lane 1: peak 1; lane 2: peak 2; lane 3: peak 3; lane 4: pooled between peak 2-3; lane 5: positive control (C-type lysozyme)

**ตารางที่ 1** ผลการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทา

Purification step	Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (Unit;U)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme	3.61	900	14.88	4.12	13392	100	1
pH4 precipitation	3.30	930	14.57	4.42	13550	101.18	1.07
pH7 precipitation	3.21	960	14.73	4.59	14141	105.59	1.11
Cation-exchange	0.52	400	20.31	39.06	8124	60.66	9.48
Gel filtration Peak 1	0.38	20	15.15	39.87	303	2.26	9.68
Gel filtration Peak 2	0.42	78	15.24	36.29	1188.72	8.89	8.81
Gel filtration Peak 3	0.31	90	18.67	60.23	1680.30	12.55	14.62

## 2. การหาค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ของ เอนไซม์

ผลจากการนำไลโซไซม์ จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศที่แยกบริสุทธิ์ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาค่า pI โดยวิธี 2D-PAGE และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum ผลปรากฏว่า พบจุด (spot) โปรตีนขนาดใหญ่ที่บริเวณ 21 kDa ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์พบว่าจุดโปรตีนนี้มีค่า pI เท่ากับ 9.95 (รูปที่ 5)

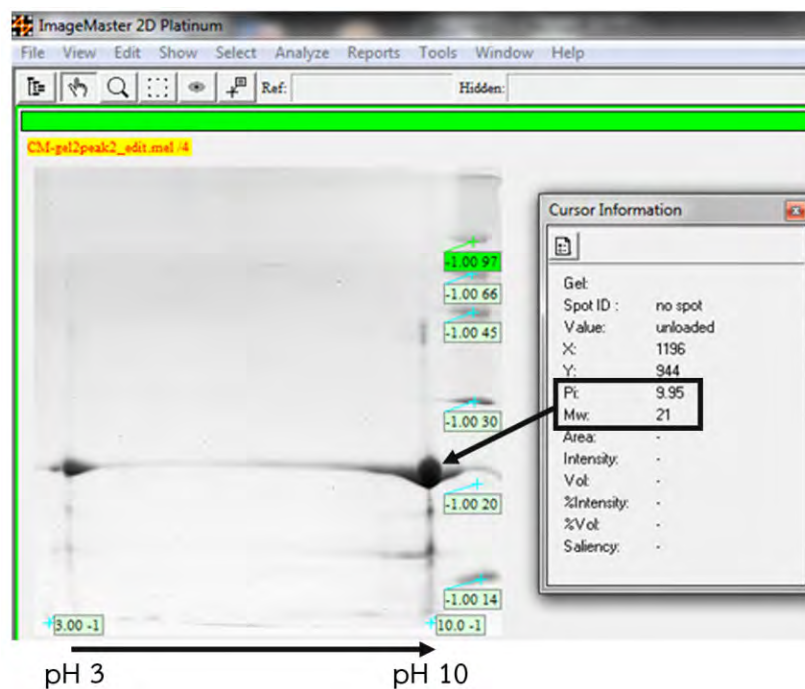
## 3. การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH)

จากการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ (Ostrich egg white lysozyme; OEWL) เปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ (Hen egg white lysozyme; HEWL) ผลปรากฏว่าค่า pH ที่ทำให้ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ มีกิจกรรมการ

ทำงานสูงสุด มีอยู่ 2 ค่าคือ ที่ pH 4 และที่ pH 7 ส่วนไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่มิ optimum pH อยู่ในช่วง pH 6-7 (รูปที่ 6)

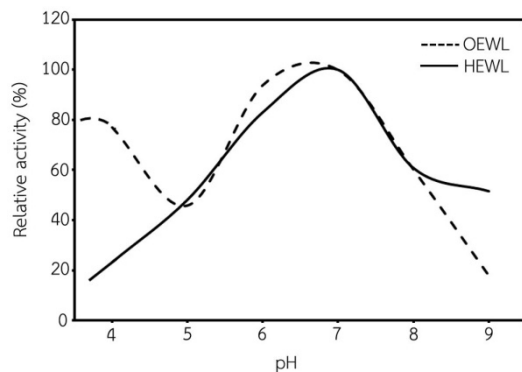
## 4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum Temperature)

การศึกษานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ (Ostrich egg white lysozyme; OEWL) เปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ (Hen egg white lysozyme; HEWL) พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ มีกิจกรรมการทำงานสูงสุด คือ ที่อุณหภูมิ 30 °C (รูปที่ 7) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระจอกเทศ กลับมีกิจกรรมการทำงานต่ำลง ส่วนอุณหภูมิที่ทำให้ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่มิกิจกรรมการทำงานสูงสุด คือที่อุณหภูมิ 40 °C และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ ก็พบว่ากิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ลดต่ำลงเช่นกัน (รูปที่ 7)

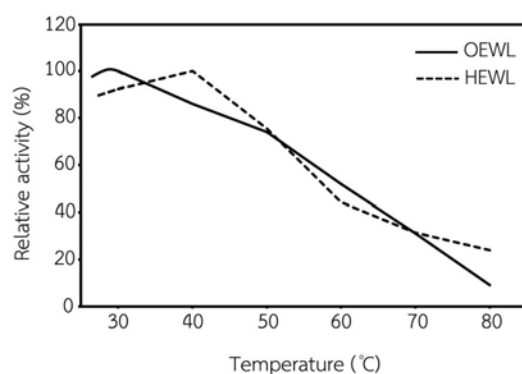


รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์หาค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ด้วยเทคนิค 2D-PAGE โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 7 cm, 13%SDS-PAGE และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum





รูปที่ 6 ผลการหา optimum pH ของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทา (OEWL) เปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ (HEWL)



รูปที่ 7 ผลการหา optimum temperature ของไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทา (OEWL) เปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ (HEWL)

### วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

ในการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาในครั้งนี้เริ่มจากการตกตะกอนโปรตีนที่มีค่า pI เท่ากับ 4 และ 7 ด้วย pH 4 และ pH 7 ตามลำดับ ก่อนจะนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ซึ่งที่ค่า pH ทั้ง 2 ค่าดังกล่าวข้างต้น ไลโซไซม์จะไม่ตกตะกอนและยังคงอยู่ในส่วน supernatant เนื่องจากไลโซไซม์ชนิด G มีค่า pI ประมาณ 9 (Callewaert and Michiels, 2010) จากผลการทดลองดังรูปที่ 3 และตารางที่ 1 พบว่าการตกตะกอนด้วย pH 4 สามารถกำจัดโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในไข่ขาวของไข่นกกระทาออกไปได้เพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกับ pH 7 แต่การตกตะกอนด้วย pH 7 นั้นเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากต้องนำตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cation-exchange chromatography ซึ่งอาศัยการแลกเปลี่ยนประจุบวกของโปรตีนกับเรซิน โดยในสภาวะ pH 7 ไลโซไซม์ที่มีค่า pI ประมาณ 9 จะแตกตัวให้ประจุสุทธิเป็นบวก และสามารถจับกับเรซินที่มี

ประจุลบได้ แล้วทำให้เกิดการแยกของโปรตีนได้โดยอาศัยการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งโปรตีนที่แตกตัวเป็นประจุบวกได้น้อยหรือไม่จับกับเรซิน (โปรตีนที่มีประจุลบ, acidic protein) ก็จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ส่วนโปรตีนที่มีประจุบวก (basic protein) จะถูกชะออกมาที่หลังด้วยการแทนที่ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยในการแยกบริสุทธิ์ด้วย CM-Toyopearl 650M cation-exchange chromatography ใช้อัตราการไหล 0.5 ml/min และทำการชะโปรตีนแบบ stepwise โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.2-0.5 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ผลการทดลองพบว่า peak ของโปรตีนหลาย peak ที่ถูกชะออกมาตามความสามารถในการแตกตัวของประจุบวก (รูปที่ 1) และเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงาน พบว่าเป็นไลโซไซม์เพียง peak เดียว ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้นของเกลือ เท่ากับ 0.2-0.3 M NaCl และเนื่องจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี cation-exchange chromatography นั้นสามารถกำจัดได้เพียงโปรตีนที่มีประจุลบ

เท่านั้น แต่โปรตีนที่มีประจุบวกรวมถึงไลโซไซม์นั้น จะไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้ ดังนั้นเพื่อเป็นการทำให้โปรตีนไลโซไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงได้ทำการเก็บเฉพาะ fraction ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ดีที่สุดมาทำการแยกบริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-75 gel filtration โดยใช้อัตราการไหล 0.3 ml/min และทำการชะคอลัมน์ ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ พบกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์จำนวน 3 peak โดยไลโซไซม์ peak ที่ 1 จะมีกิจกรรมการทำงานต่ำเมื่อเทียบกับ peak ที่ 2 และ 3 ถึงแม้ว่า peak โปรตีนทั้ง 3 จะมีปริมาณการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 280 nm ที่สูงใกล้เคียงกันก็ตาม (รูปที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องจากไลโซไซม์ใน peak ที่ 1 มีการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นจำนวนมาก จากนั้นจึงทำการเก็บรวม fraction ที่มีกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์และทำการไดอะไลซิสเพื่อกำจัดเกลือ แล้วจึงเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งทั้ง 3 peak พบแถบโปรตีนที่คาดว่าจะเป็ นไลโซไซม์ชนิด G ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับไลโซไซม์ชนิด G ดังที่เคยมีรายงานไว้ (Zhao et al., 2011, Thammasirak et al., 2010; Callewaert and Michiels, 2010; Zhao et al., 2007) และจากผลการทำ refolding gel สามารถยืนยันได้ว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นเป็นไลโซไซม์จริง โดยดูจากลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้น ซึ่งหมายถึงมีการย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียที่เป็นซับสเตรตของไลโซไซม์บริเวณที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 21 kDa เมื่อนำไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปหาค่า pI ด้วยเทคนิค 2D-PAGE และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum พบว่ามีจุดโปรตีนขนาดใหญ่ อยู่ที่ประมาณ 21 kDa และมีค่า pI ประมาณ 9.95 ซึ่งค่า pI ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่า pI ของไลโซไซม์ชนิด G ที่มีรายงานไว้ (Callewaert and Michiels, 2010; Thammasirak et al., 2010) ส่วนผลจากการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากไข่ขาวของไข่นกกระทาเทศ มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 4 และ pH 7 ในขณะที่ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 6-7 ซึ่งการที่ไลโซไซม์มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน

ของเอนไซม์อยู่ 2 ค่าอาจเกิดจากความสามารถในการจับกันของเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแตกตัวของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณเร่งเอนไซม์ (Glu, Asp) ที่อาจเกิดการแตกตัวได้ดีที่ค่า pH ต่างกัน (Thammasirak et al., 2005) และผลจากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของไลโซไซม์จากไข่นกกระทาเทศที่แยกบริสุทธิ์ได้พบว่าอยู่ที่อุณหภูมิ 30 °C แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่ากิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์จะมีค่าต่ำลง ส่วนอุณหภูมิที่ส่งผลให้เอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดคือ ที่อุณหภูมิ 40 °C และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นก็พบว่าไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่มีกิจกรรมการทำงานลดต่ำลงเช่นเดียวกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาเทศ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่มีกิจกรรมการทำงานสูงกว่าไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่นกกระทาเทศ ทั้งนี้อาจเนื่องจากไลโซไซม์จากไข่ไก่นั้นประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) มากกว่าไลโซไซม์จากไข่นกกระทาเทศ (Kawamura et al., 2008; Guez et al., 2002) จึงส่งผลให้มีโครงสร้างที่แข็งแรงมากกว่า และทำให้สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่า

จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า สามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ชนิด G จากไข่ขาวของไข่นกกระทาเทศ ได้ โดยการตกตะกอนโปรตีนชนิดอื่นออกด้วยคุณสมบัติของค่าไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน และนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี cation-exchange chromatography ร่วมกับ gel filtration chromatography โดยไลโซไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa มีค่า specific activity เท่ากับ 60.23 unit/mg และมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 1680.30 unit

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณสาขาชีวเคมี และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัยจนคณะผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วง

## เอกสารอ้างอิง

- ไชยวัฒน์ สาดรัมย์. (2561). AKARA โลชั่นนกกกระจอกเทศ. โพสต์ทูเดย์. แหล่งข้อมูล : <https://www.posttoday.com/economy/sme/543830>. ค้นเมื่อวันที่ 4 กันยายน 2563.
- พัชรี บุญศิริ และ จุริรัตน์ ปูอาจ. (2545). โลโซไซม์: ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 14(1): 15-26.
- ศิริพันธ์ จำรูญศิริ โมราภ. (2544). การเลี้ยงนกกกระจอกเทศ. พิมพ์ครั้งแรก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อรุณผลการพิมพ์. หน้า 1-13.
- วสันต์ สุขวรรณมณี. (2545). คู่มือการเลี้ยงนกกกระจอกเทศ. พิมพ์ครั้งแรก. นนทบุรี: สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์. หน้า 1-36.
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y. and Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents. Poultry Science 92: 3292–3299.
- Amano, K. and Ito, E. (1978). The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. European Journal of Biochemistry 85: 97-104.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1–2): 248–254.
- Buonocore, F., Randelli, E., Trisolino, P., Facchiano, A., De Pascale, D. and Scapigliati, G. (2014). Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular Immunology 62(1): 10-8.
- Callewaert, L. and Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. Journal of Biosciences 35(1): 127-160.
- Canfield, R. E. and McMurry, S. (1967). Purification and characterization of lysozyme from goose egg white. Biochemical and Biophysical Research Communications 26: 38-42.
- Chipman, D. M., Grisaro, V. and Sharon, N. (1967). The binding of oligosaccharides containing N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid to lysozyme, the specificity of binding substrates. Journal of Biological Chemistry 242(19): 4388-4394.
- Guez, V., PRoux, P., Navon, A. and Goldberg, M. E. (2002). Role of individual disulfide bonds in hen lysozyme early folding steps. Protein Science 11(5): 1136-1151.
- Hasselberger, F. X. (1978). Uses of enzymes and immobilized enzymes. Chicago: Nelson-Hall Inc. pp. 117-113.
- Hikima, J., Horono, I. and Aoki, T. (1997). Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Molecular marine biology and biotechnology 6(4): 339-344.
- Hikima, J., Minagawa, S., Hirono, I. and Aoki, T. (2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene and the lytic activity of its recombinant protein. Biochimica et Biophysica Acta 1520(1): 35-44.
- Homayouni-Tabrizi, M., Asoodej, A., Abbaszadengan, M. R., Shahrokhabadi, K. and Moghaddam, M. N. (2015). An identified antioxidant peptide obtained from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysate shows wound healing properties. Pharmaceutical Biology 53: 1155-1162.
- Jolles, P. and Jolles, J. (1984). What's new in lysozyme research always a model system, today as yesterday. Molecular and Cellular Biochemistry 63: 165-189.
- Kajla, M. K., Andreeva, O., Gilbreath, T. M. III. and Paskewitz, S. M. (2010). Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 155(2): 201–209.
- Kawamura, S., Ohkuma, M., Chijiwa, Y., Kohno, D., Nakagawa, H., Hirakawa, H., Kuhara, S. and Torikata, T. (2008). Role of disulfide bonds in goose-type lysozyme. FEBS Journal 275(11): 2818-2830.
- Kokoshis, P. L., Willeams, D. L., Cook, J. A. and Di Luzio, N. R. (1978). Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. Science 199: 1340-1342.
- Kristiansen, A., Varum, K. M. and Grasdalen, H. (1998). Quantitative studies of the nonproductive binding of lysozyme to partially N-acetylated chitosan. Biochimica et Biophysica Acta 1425: 137-150.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Sun, Y., Kung, H. F., Blithe, D. L. and Chen, H. C. (1999). Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 2678-2681.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R. and Ramos, M. (2005). Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *European Food Research and Technology* 221: 542-546.
- Nakano, T. and Graf, T. (1991). Goose-type lysozyme gene of the chicken; sequence, genomic organization and expression reveals major differences to chicken-type lysozyme gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1090: 273-276.
- Nordtveit, R. J., Varum, K. M. and Smidsrod, O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydrate Polymer* 29: 163-167.
- Pooart, J., Torikata, T., and Araki, T. (2004) The primary structure of a novel goose-type lysozyme from rhea egg white. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68(1): 159-169.
- Samaranayake, Y. H., Sammaranayake, L. P., Pow, E. H., Beena, V. T. and Yeung, K. W. (2001). Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus infected Southern Chinese cohort. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3296-3302.
- Sava, G., Ceschia, V. and Zabucchi, G. (1988). Evidence for host-mediated antitumor effects of lysozyme in mice bearing the MCa mammary carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 24(11): 1737-1743.
- Simpson, R. J. and Morgan, F. J. (1983). Complete amino acid sequence of Embden goose (Anseranser) egg white lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 744: 349-351.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 8: 302-309.
- Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K. and Araki, T. (2001). Purification and characterization of goose type lysozyme from cassowary (*Casuarius casuarius*) egg white. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 584-592.
- Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K. and Araki, T. (2002). The primary structure of cassowary (*Casuarius casuarius*) goose-type lysozyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66: 147-156.
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y. and Daduang, S. (2005). Purification and Characterization of G-type Lysozymes from Ostrich Egg White. *Laos Journal on Applied Science* 1(1): 287-294.
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharram, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T. and Araki, T. (2010). Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 151: 84-91.
- Vanderkelen, L., Van Herreweghe, J. M., Vanoirbeek, K. G. A., Baggerman, G., Myrnes, B., Declerck, P. J., Nilsen, I. W., Michiels, C. W. and Callewaert, L. (2011). Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 1053-1064.
- Varum, K. M., Holme, H. K., Izume, M., Stokke, B. J. and Smidsrod, O. (1996). Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochimica et Biophysica Acta* 1291: 5-15.
- Yin, Z. X., He, J. G., Deng, W. X. and Chan, S. M. (2003). Molecular cloning, expression of orange spotted grouper goose-type lysozyme cDNA and lytic activity of its recombinants protein. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 117-123.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W. and Xu, W. (2007). Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *chlamysfarreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology* 44: 1198-1208.
- Zhao, L., Sun, J. and Sun, L. (2011). The g-type lysozyme of *Scophthalmus maximus* has a broad substrate spectrum and is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology* 30: 630-637.