

การแยกบริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีและทางโครงสร้างของโปรตีนไลโซไซม์ (Lysozyme) ในไข่ขาวของตะพาน้ำ (*Trionyx sinensis tiwanese*)

พลากร พลโยธี¹⁾ ศักดา ดาดวง¹⁾ วีรศักดิ์ สมดี²⁾ และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์^{*1)}

1) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น * Email : somkly@kku.ac.th

2) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาน้ำ (SSTL) สายพันธุ์ได้หวนโดยทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์ด้วยเทคนิค pH precipitation และ cation exchange column chromatography พบว่าสามารถแยกไลโซไซม์ได้ 2 ชนิด คือ ไลโซไซม์พีค A และ ไลโซไซม์พีค B เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทั้งสองด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนทั้งสองมีมวลโมเลกุล (MW) ประมาณ 14.8 kDa และสามารถยืนยันว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็นไลโซไซม์ได้ด้วย Refolding gel การศึกษาหาความแตกต่างของไลโซไซม์ทั้งสองชนิดด้วย Native-PAGE พบว่า ไลโซไซม์พีค B จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบได้เร็วกว่าไลโซไซม์พีค A สำหรับการศึกษาสมบัติทางด้านเคมีนั้นพบว่าไลโซไซม์ทั้งสองชนิดมี pH optimum ที่ pH 6.0 และต่างก็มีสมบัติเป็น thermostable เหมือนกันกับ HEWL จากการศึกษาสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียโดย lysoplate assay พบว่าไลโซไซม์พีค A และ B สามารถต้านเชื้อ *M. luteus* และ *S. aureus* ได้ดีกว่ากันและสูงกว่า HEWL และการศึกษา N-terminal sequencing ของไลโซไซม์พีค B พบว่าทางด้านปลายของหมู่อะมิโนมีลำดับเป็น G-K-I/L

คำสำคัญ : ตะพาน้ำ, ไลโซไซม์, ไข่ตะพาน้ำ, innate immunity

1.บทนำ

ไลโซไซม์ (Lysozyme or Muramidase ; EC 3.2.1.17) เป็น innate immunity ซึ่งสิ่งมีชีวิตใช้เป็น defense mechanism ในการป้องกันตนเองจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอม โดยไลโซไซม์จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic linkages) ระหว่าง *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) และ *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) ซึ่งเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ที่เป็นส่วนประกอบของเพปติโดไกลแคนในโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถพบไลโซไซม์ได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น ในซีรัม น้ำตา น้ำลาย น้ำนม ยางมะละกอ และพบมากในไข่ขาวของสัตว์ปีก ฯลฯ ปัจจุบันสามารถจำแนกไลโซไซม์ได้เป็นสามชนิดตาม

จำนวนกรดอะมิโน ได้แก่ 1) chicken-type lysozyme (C-type) 2) goose-type lysozyme (G-type) 3) T₄ phage lysozyme (phage type)

การศึกษาทั้งทางด้านกลไกการทำงานและทางโครงสร้างของไลโซไซม์นั้นมีการศึกษาอย่างมากมาย ใน C-type แต่ข้อมูลดังกล่าวในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานมีการศึกษาน้อยมากถึงแม้ว่าสัตว์ปีกจะมีวิวัฒนาการมาจากสัตว์เลื้อยคลานก็ตาม ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์ไลโซไซม์ในไข่ขาวของตะพาน้ำจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเข้าใจบทบาทและหน้าที่ของ innate immunity ในสัตว์เลื้อยคลานและช่วยให้สามารถสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง innate immunity กับอัตราการตายของตะพาน้ำตั้งแต่อยู่ในไข่ได้ ทั้งยังเป็นข้อมูลที่

สามารถนำไปเปรียบเทียบกับไลโซไซม์ชนิดอื่นๆได้ ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ หรือกระทั่งกลไกในการป้องกันเชื้อโรคของไลโซไซม์ที่มีอยู่ในไข่ขาวของตะพานน้ำเอง

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์

เจือจางไข่ขาวของตะพานน้ำสามเท่าด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ผสมให้เข้ากันด้วย homogenizer นำไป stir ที่อุณหภูมิ 4 °C 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 xg 15 นาที นำไปตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.0 ด้วย 1 N HCl stir 1 ชม. แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 xg 30 นาที ตกตะกอนโปรตีนอีกครั้งที่ pH 7.0 ด้วย 1 N NaOH stir 1 ชม. นำไปปั่นที่ 12,000 xg 30 นาที จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ไป applied ลงในคอลัมน์ที่ผ่านการ equilibrated ด้วย 0.03 M sodium-phosphate buffer pH 7.0 ล้างคอลัมน์ด้วย buffer เดิม ประมาณ 300 ml จากนั้นชะโปรตีนออกแบบ linear gradient ด้วย 0.03 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากความเข้มข้น 0 -0.25 โมลาร์ แล้วนำสารละลายในแต่ละ fraction ไปวัด $A_{280\text{ nm}}$ และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลโซไซม์ (lytic activity : การย่อยผนังเซลล์แบคทีเรีย) แล้ว pooled fraction ที่มีแอกติวิตี ทำ dialysis แล้วทำ lyophilized เก็บโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ไว้ที่ -70 °C

2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลโซไซม์

สับสเตรต คือ *Micrococcus luteus* ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 วัดค่า OD ให้ได้ 0.9-1 โดยใช้สับสเตรตปริมาตร 3 ml จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ 100 μL ผสมกันใน cuvette พร้อมกับเริ่มจับเวลาทันที อ่านค่า $OD_{540\text{ nm}}$ ที่ลดลงทุกๆหนึ่งนาทีเป็นเวลาสามนาทีและคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ โดย 1 unit คือแอกติวิตีของไลโซไซม์ปริมาตร 1 ml ที่ลดค่า $OD_{540\text{ nm}}$ ไป 0.1 ในเวลา 1 นาที (Araki,1994)

2.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE

ตรวจสอบตามวิธีของ Laemmli (1970) และย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue R250

2.4 การตรวจสอบเอนไซม์ไลโซไซม์ด้วย Refolding gel

ตรวจสอบตามวิธีของ Markus และคณะ (2003)

2.5 การตรวจสอบความคุณสมบัติของโปรตีนด้วย Native-PAGE

เตรียม 6% Acrylamide gel ไม่ผสม SDS นำ maker และ sample โหลลงบนแผ่นเจล โดยไม่นำ sample ไปผ่านความร้อนให้เสียสภาพ สีย้อมไม่มี β -mercaptoethanol ใช้ electrode buffer pH 8.3 ในการวิเคราะห์ electrophoresis แยกโดยให้โปรตีนวิ่งจากขั้วบวกไปลบ แล้วทำการทดลอง PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970)

2.6 การศึกษา pH optimum ของเอนไซม์ไลโซไซม์

เตรียม Miller & Golder buffer โดยให้มี pH เป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ ionic strength 0.1 จากนั้นเตรียมสับสเตรตที่ pH ต่างๆโดยใช้ buffer ที่เตรียมไว้ผสม lyophilized *M. luteus* ลงไป วัดค่า $OD_{540\text{ nm}}$ ให้อยู่ในช่วง 0.90-1.00 แล้วนำไปศึกษา pH optimum ของไลโซไซม์ โดยศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองฟีกในการย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียที่ pH ต่างๆเปรียบเทียบกับ HEWL ใช้ความเข้มข้นของไลโซไซม์ 1 mg/ml

2.7 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลโซไซม์

เตรียม lyophilized *M. luteus* ใน 0.1 M Na-phosphate buffer pH 6.0 ใช้สารละลายไลโซไซม์ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลโซไซม์โดย incubate สารละลายไลโซไซม์ที่ อุณหภูมิ 65 °C และ 90 °C แต่เวลาต่างกันเริ่มจาก 0, 30,..., 180 นาที จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์แช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีประมาณ 20 นาทีและทิ้งให้หมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องทำการวัด

แอกติวิตีของเอนไซม์ไลโซไซม์

2.8 การศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อ

แบคทีเรียด้วย lysoplate assay

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร Mueller Hinton Agar ที่ 37°C 16-18 ชม. คัดเลือก single colony มาเลี้ยงต่อใน Nutrient Broth ที่ 37°C 16-18 ชม. ทำการปั่นแยกเซลล์ที่ 4000 rpm. 10 นาที จากนั้นดูด media ที่ล้างด้วย 0.9% NaCl นำไป vortex แล้วปั่นแยกเซลล์อีกครั้งที่ 4000 rpm. 10 นาที ดูดน้ำเกลือทิ้งใช้ 50 mM phosphate buffer pH 6.2 ล้างน้ำเกลือออกแล้วปั่นแยกเซลล์ที่ 4000 rpm. 10 นาที ดูด buffer ที่ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 6.2 ประมาณ 10 ml ละลายเซลล์ให้ได้ค่า OD. ≥ 2 แล้ว incubate ที่ 40°C จากนั้นใช้ 50 mM phosphate buffer pH 6.2 ประมาณ 10 ml เตรียม 1% Agarose gel แล้วผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันเท plate เมื่อ plate แข็งได้ทีแล้วจึงทำการ Applied samples ประมาณ 500 μ g (ความเข้มข้นของไลโซไซม์ 1 mg/ml) ลงในหลุมของแต่ละ plates ที่มีเชื้อต่างชนิดกัน นำไป incubate ที่ 37°C ประมาณ 16-18 ชม. จากนั้นทำการวัด diameters ของ clear zone

2.9 การหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโน (N-terminal sequencing)

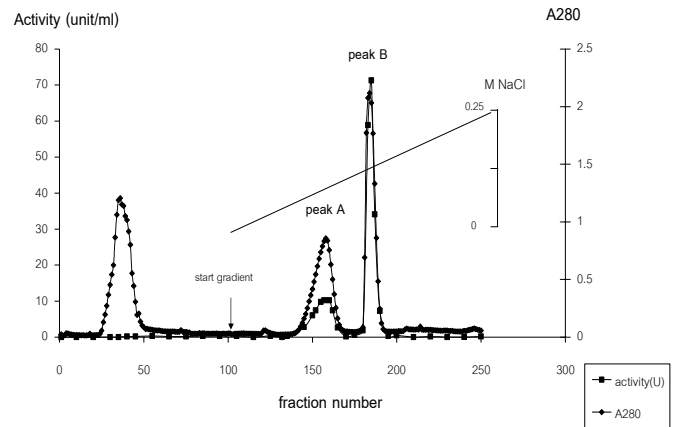
การหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโนทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา Edman degradation ซึ่งในการทดลองนี้จะให้โปรตีนไลโซไซม์ทำปฏิกิริยา double coupling กับสารสองชนิดคือ DABITC และ PITC ติดตามผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (PTH-amino acid) ด้วย TLC แบบ two dimensions แล้วเทียบกับ Standard amino acid

3. ผลการทดลอง

3.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีนไลโซไซม์

การทำบริสุทธิ์โปรตีนไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพานน้ำประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ การตกตะกอน

ด้วยค่า pH และแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 1



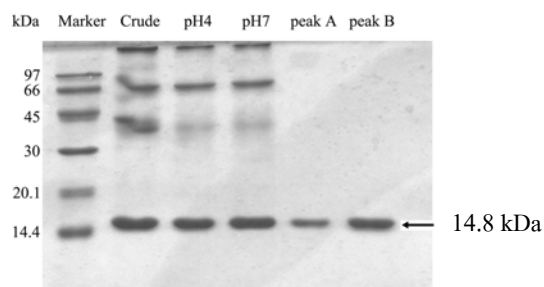
รูปที่ 1. Elution profile ของการทำบริสุทธิ์ SSSLT

ด้วย CM-Toyopearl 650M cation exchange column chromatography ขนาด 1 x 86 cm flow rate 15 ml/hr จะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบ linear gradient ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 0.00-0.25 โมลาร์

จากกราฟพบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ได้อย่างชัดเจนสองพีค คือ peak A และ peak B ตามลำดับและ peak B จะมีแอกติวิตีสูงกว่า peak A

3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนไลโซไซม์ด้วย SDS-PAGE

จากผลการทดลองพบว่าทั้ง peak A และ peak B จะมีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ crude, pH 4 precipitation, pH 7 precipitation และจะเห็นได้ว่าสามารถทำบริสุทธิ์ SSSLT ได้ซึ่ง peak A มีความบริสุทธิ์ประมาณ 6 เท่า และ peak B มีความบริสุทธิ์ประมาณ 3 เท่า เมื่อทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนดังกล่าวคือ 14.8 kDa ดังรูปที่ 2

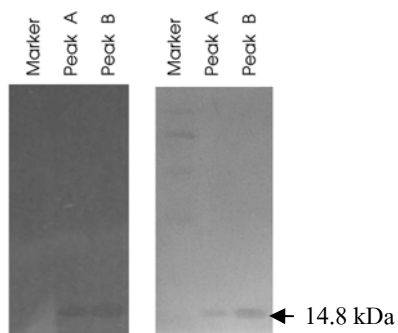


รูปที่ 2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของ SSTL ด้วย 12.5 % SDS-PAGE

lane 1 : Molecular weight marker proteins, lane 2 : Crude enzyme, lane 3 : pH4 precipitate, lane 4 : pH7 precipitate, lane 5 : pooled fraction from peak A, lane 6 : pooled fraction from peak B

3.3 การตรวจสอบเอนไซม์ไลโซไซม์ด้วย Refolding gel

นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาตรวจสอบด้วย refolding gel เพื่อยืนยันว่าแถบโปรตีนที่ประมาณ 14.8 kDa เป็นไลโซไซม์จริงโดยทำการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล จากผลการทดลองพบว่า มี clear zone เกิดขึ้นที่แถบโปรตีนประมาณ 14.8 kDa นั้นแสดงว่าแถบโปรตีนดังกล่าวคือแถบโปรตีนของไลโซไซม์ทั้งสองพีค ดังรูปที่ 3

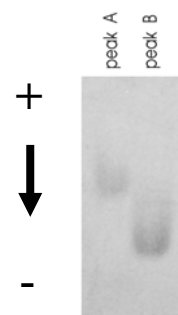


รูปที่ 3. Refolding gel (A) ก่อนย้อมด้วย coomassie brilliant blue R (ถ่ายภาพโดยใช้พื้นหลังสีดำ) (B) หลังย้อมด้วย coomassie brilliant blue R250

3.4 การตรวจสอบความคุณสมบัติของโปรตีน

เบื้องต้นด้วย Native-PAGE

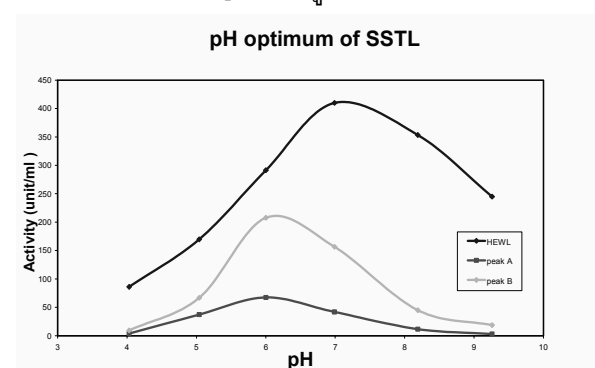
วิธีนี้เป็นการศึกษาสมบัติของโปรตีนไลโซไซม์ในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นโปรตีนจึงถูกแยกตามขนาดความหนาแน่น และประจุ โดยในการศึกษารั้งนี้จะวิเคราะห์ electrophoresis ที่ผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วบวกไปขั้วลบ จากผลการทดลองจะเห็นไลโซไซม์พีค B มีความสามารถในการวิ่งเข้าหาขั้วลบได้ดีกว่าไลโซไซม์พีค A ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4. Native-PAGE ของไลโซไซม์ทั้งสองพีค

3.5 การศึกษา pH optimum

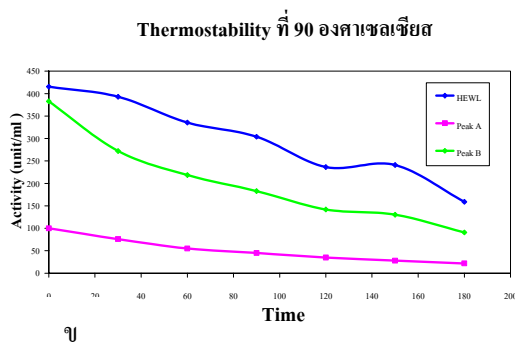
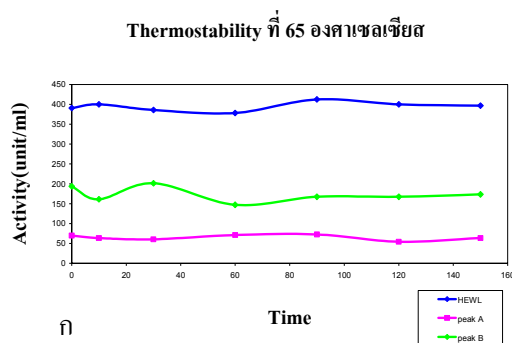
การศึกษาเพื่อหา pH ที่ SSTL ทั้งสองพีคมีแอกติวิตีสูงที่สุดเปรียบเทียบกับ HEWL พบว่า pH optimum ของไลโซไซม์ทั้งสองพีคของ SSTL คือ pH ประมาณ 6 ส่วน pH optimum ของ HEWL มีค่าอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ pH 6.5-8.5 (จากการคำนวณ relative activity) โดยที่ SSTL ทั้งสอง peak จะมีแอกติวิตีที่เหลืออยู่ประมาณ 10-20% ที่ pH 8.0 (รูปที่ 5)



รูปที่ 5. pH optimum ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส
ผนังเซลล์ของ *M. luteus* ของ SSTL และ HEWL

3.6 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลโซไซม์

ผลการศึกษาแอกติวิตีของ SSTL และ HEWL ที่
อุณหภูมิ 65° C และ 90° C พบว่าที่อุณหภูมิ 65° C
เอนไซม์ไลโซไซม์ทั้งสามชนิดยังมีแอกติวิตีอยู่มากกว่า
90% เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชม. (รูปที่ 6 ก) ซึ่งถือว่า
คุณสมบัติเป็น thermostable และที่อุณหภูมิ 90° C
HEWL จะมีแอกติวิตีลดลง 50% เมื่อเวลาผ่านไป 2
ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจาก SSTL ที่มีแอกติวิตีลดลง 50%
เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. (รูปที่ 6 ข)

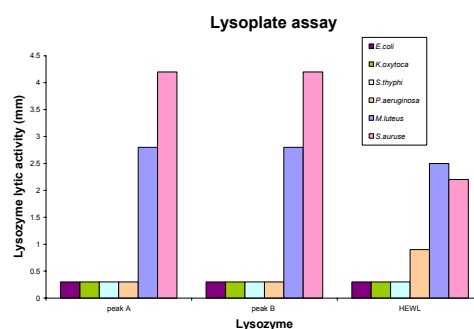


รูปที่ 6. การศึกษาแอกติวิตีของ SSTL และ HEWL ที่
อุณหภูมิ 65° C และ 90° C

3.7 ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ศึกษาความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย
ชนิดต่างๆที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของตะพาบน้ำโดย
เทคนิค lysoplate assay ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรียต่างๆดังนี้
E.coli, *K. oxytoca*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *M. luteus*,

S. aureus จากผลการทดลองพบว่า SSTL ทั้งสองพีคมี
ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* และ
S. aureus ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้เท่ากันและสูง
กว่า HEWL ส่วน HEWL นั้นสามารถทำลายได้ทั้ง
แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ คือ *M. luteus*,
S. aureus และ *P. aeruginosa* ดังรูป 7



รูปที่ 7. ความสามารถในการต้านเชื้อ 6 ชนิดของไลโซ
ไซม์ทั้งสามชนิด

3.8 การหาลำดับกรดอะมิโนทางปลายด้านอะมิโน (N-terminal sequencing)

ผลการหาลำดับกรดอะมิโนจากปลายด้านอะมิโน
ของ HEWL และ SSTL ตามลำดับดังนี้

HEWL	K- V- F- G
SSTL Peak A	? - ? - ? - ?
SSTL Peak B	G- K- I/L- ?

4. อภิปรายผลการทดลอง

จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์สามารถแยก
โปรตีนที่มีไลโซไซม์แอกติวิตีได้สองพีค คือ peak A
และ peak B ตามลำดับซึ่งถือว่าเป็นรายงานแรกที่มี
การพบไลโซไซม์หลายชนิดในไข่ขาวของ
สัตว์เลื้อยคลาน เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์จาก SDS-
PAGE พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์ได้มากขึ้นโดยพีค A มี
ความบริสุทธิ์ประมาณ 6 เท่า และ พีค B มีความ
บริสุทธิ์ประมาณ 3 เท่า และเมื่อทำการตรวจสอบ
น้ำหนักโมเลกุลพบว่า น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

ดังกล่าวคือ 14.8 kDa ใกล้เคียงกับ 14.4 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักของ HEWL และคาดว่าเป็น C-type ไลโซไซม์ที่เคยมีรายงานไว้ (Cluss et al., 1998 ; Voet, D. and Voet, J., 1995) เมื่อนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาตรวจสอบยืนยันด้วย refolding gel ซึ่งพบ clear zone ที่ประมาณ 14.8 kDa นั้นแสดงว่าเป็นไลโซไซม์จริงและยืนยันการพบของไลโซไซม์ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานสำหรับการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลโซไซม์ฟิค A และฟิค B ด้วย Native-PAGE พบว่าไลโซไซม์ฟิค B มีความสามารถในการวิ่งเข้าหาประจุลบได้ดีกว่าไลโซไซม์ฟิค A แสดงว่าไลโซไซม์ฟิค B น่าจะมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic amino acid residues) หรือประจุลบมากกว่าไลโซไซม์ฟิค A ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ elution profile ของ cation exchange column chromatography ผลการศึกษา pH optimum พบว่า HEWL จะมี broad pH optimum คือจาก 6.5-8.5 ในขณะที่ SSTL จะมี pH optimum ประมาณ 6 ซึ่งเป็นไปได้ว่าไลโซไซม์ทั้งสองตัวในไข่ขาวของตะพานน้ำ จากการศึกษาลักษณะของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลโซไซม์ทั้งสองพบว่าเอนไซม์มีคุณสมบัติเป็น thermostable เหมือนกับ HEWL และสอดคล้องกับการรายงานที่เคยมีไว้ (Thammasirak และคณะ, 2001) ผลการหาลำดับกรดอะมิโนทางปลายด้านอะมิโน พบว่าของ SSTL ฟิค B มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้คือ G-K-I/L เมื่อเปรียบเทียบกับของ HEWL ที่หาได้คือ K-V-F-G จะพบว่ามี insertion ของ G ก่อน K ในไลโซไซม์ของตะพานน้ำซึ่งเคยรายงานในไลโซไซม์ของ Japanese pheasant และ ring-necked pheasant (Jollés et al., 1979) เป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากกระบวนการ post translational modification ที่เปลี่ยนแปลงไป

5. สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นรายงานแรกที่พบไลโซไซม์สองชนิดในไข่ขาวของตะพานน้ำ จากการศึกษาลักษณะสมบัติทั้ง

ทางเคมีและทางโครงสร้างของไลโซไซม์ในไข่ขาวของตะพานน้ำสรุปได้ว่ามีคุณสมบัติเป็น type C แต่ SSTL มีสมบัติทางเคมีและทางโครงสร้างบางอย่างที่ต่างจาก HEWL ซึ่งการศึกษา complete amino acid sequence จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สกว. ทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นและทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงงานอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2546 และบางเสร่ฟาร์มตะพานน้ำที่เอื้อเพื่อไข่ตะพานน้ำ

เอกสารอ้างอิง

- Araki, T.; Yamamoto, T.; Torikata, T. Reptile lysozyme : The Complete Amino Acid Sequence of Soft-shelled turtle lysozyme and its Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62 (2), 316-324.
- Jollés, J.; Jollés, P. Lysozymes' esterase activity. *FEBS.* **1983**, 162(1), 120-123.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- Thammasirak, S.; Torikata, T.; Takami, K.; Murata, K.; Araki, T., Purification and characterization of goose type lysozyme from cassowary (*Casarius casurius*) egg white. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, 65(3), 584-592.
- Voet, Donald and Judith. *Biochemistry 2nd. ed.* John Wiley & Sons: New York, 1995.