

การพัฒนาการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์อย่างง่ายจากไข่ขาวของไข่ไก่

สุพรรณษา กิจไธสง ผศ.ดร.ศักดา ดาดวง และ ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ *

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

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ให้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยหลักการของ reducing agent ร่วมกับความร้อนเพื่อกำจัดโปรตีนอื่นๆในไข่ขาวของไข่ไก่จากการศึกษา reducing agent หลายชนิด ความเข้มข้นที่เหมาะสมและอุณหภูมิในการเตรียมแยกไลโซไซม์ พบว่าการใช้ 1.5% ascorbic acid ผสมกับสารละลายไข่ขาวนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาทีจะให้เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery) ของเอนไซม์สูงที่สุด จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ไปทำบริสุทธิ์ด้วย cation exchange column chromatography และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE พบว่าไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.5 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ที่แยกได้จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่พบว่าได้ปริมาณไลโซไซม์มากกว่าวิธีมาตรฐานถึง 4 เท่า และประหยัดเวลากว่า 151 ชั่วโมง

คำสำคัญ : ไลโซไซม์, โปรตีนไข่ขาว, เอนไซม์, การแยกบริสุทธิ์

1. บทนำ

ไลโซไซม์ (lysozyme or muramidase; EC 3.2.1.17) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั้งในมนุษย์ สัตว์ พืช และแบคทีเรีย ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic linkages) ระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmuramic acid (MurNAc) ซึ่งเป็นเฮกเทอร์โรพอลิเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเพปติโดไกลแคนที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ในต่างประเทศมีการนำไลโซไซม์มาใช้ประโยชน์มากมายในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นระดับมากกว่า 100 ตันต่อปี เช่น อุตสาหกรรมถนอมอาหาร อุตสาหกรรมไวน์ และอุตสาหกรรมยา เพราะฉะนั้นวิธีการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จึงมีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งมีวิธีการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์หลายเทคนิคคือ gel filtration chromatography, affinity chromatography และ ion exchange chromatography แต่ทุกวิธีที่กล่าวถึงจะมีปัญหา เช่น มีราคาแพง ใช้เวลานาน ไม่สะดวกในการทำ routine use และถ้าเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานในการผลิต คือ

การตกตะกอนไลโซไซม์ใน 5% NaCl ที่ pH 9.5 ซึ่งมีข้อเสียคือต้องการเวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ เพราะฉะนั้นการเตรียมไลโซไซม์ที่รวดเร็วมีประสิทธิภาพและมีราคาถูก จึงมีความสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงต้องการพัฒนาวิธีที่ง่ายในการแยกเตรียมบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ไก่ที่บุบร้าวในอุตสาหกรรมการผลิต ซึ่งเป็นการลดต้นทุนและลดการเสียหายของอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ไข่ในประเทศโดยใช้ reducing agent ร่วมกับความร้อนเนื่องจาก reducing agent สามารถทำให้พันธะไดซัลไฟด์ระหว่างไลโซไซม์กับโปรตีนอื่นๆที่อยู่ในไข่ขาวของไข่ไก่เกิดการ rearrange ที่ถูกต้องและเหมาะสม ส่วนความร้อนจะทำให้ ovalbumin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดไข่ขาวของไข่ไก่และโปรตีนอื่นๆ ตกตะกอน แล้วแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ต่อโดย column chromatography และศึกษาสมบัติทางเคมีของไลโซไซม์ ได้แก่ pH optimum, thermo stability และ

storage test เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ใน
อุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยวิธีมาตรฐาน

เชื้อจากไข่ขาวของไข่ไก่ 3 เท่า ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ผสมให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้น นำไป stir ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซนตริฟิวส์ที่ 12,000 xg หรือ 12,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของ supernatant หรือเรียกว่า crude enzyme ไปตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ออกด้วย pH 4.0 (1 M HCl) แล้ว stir ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซนตริฟิวส์ที่ 12,000 xg หรือ 12,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำ supernatant ไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.0 ด้วย 1 M NaOH แล้ว stir ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซนตริฟิวส์ที่ 12,000 xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของ supernatant ที่ได้ทั้งหมดไป applied ลงใน column ที่ผ่านการ equilibrate ด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl ใน sodium phosphate buffer pH 7.0 300 ml แล้วชะโปรตีนแบบ step wise โดยใช้ 0.1, 0.2 และ 0.3 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 นำทุก fraction ไปวัด $A_{280\text{ nm}}$ และวัดแอกติวิตีที่ $A_{540\text{ nm}}$ pooled fraction ที่มีแอกติวิตี นำไปทำ dialysis หลังจากนั้น นำไปผ่านคอลัมน์ที่สองที่ผ่านการ equilibrate ด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl ใน sodium phosphate buffer pH 7.0 300 ml ชะโปรตีนแบบ linear gradient โดยใช้ 0.1-0.4 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 นำทุก fraction ไปวัด $A_{280\text{ nm}}$ และวัดแอกติวิตีที่ $A_{540\text{ nm}}$ pooled fraction ที่มีแอกติวิตี ไปทำ dialysis ไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ ได้ให้เก็บที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อรอศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีต่อไป

2.2 การทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่

เชื้อจากไข่ขาวของไข่ไก่ด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วย homogenizer เติม 1.5 % ascorbic acid แล้วนำไป stir ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที เซนตริฟิวส์ที่ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของ supernatant หรือเรียกว่า crude enzyme ที่ได้ทั้งหมดไป applied ลงใน cation exchange column chromatography ที่ผ่านการ equilibrate ด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ล้างแล้วชะโปรตีนแบบ linear gradient โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ 0.1-0.4 M NaCl ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 เก็บ fraction ละ 3 ml นำทุก fraction ไปวัด $A_{280\text{ nm}}$ และวัดแอกติวิตีของไลโซไซม์ที่ $A_{540\text{ nm}}$ pooled fraction ที่มีแอกติวิตี นำไปทำ dialysis แล้วทำ lyophilize เก็บเอนไซม์ที่ -70°C เพื่อรอศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีต่อไป

2.3 การวัดแอกติวิตีของไลโซไซม์

สับสเตรต คือ สารละลายเซลล์ *Micrococcus lysodeikticus* ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่มีค่า OD ที่ 540 nm เท่ากับ 0.9-1.0 ปิเปต สับสเตรต 3 ml ลงใน cuvet เติมสารละลายเอนไซม์ 100 μ l ลงไปในสารละลายสับสเตรตบันทึกค่า $OD_{540\text{ nm}}$ ที่ลดลงไปในเวลา 3 นาที โดย 1 unit ของเอนไซม์คือ แอกติวิตีของเอนไซม์ปริมาตร 1 ml ที่ลดค่า $OD_{540\text{ nm}}$ ไป 0.1 ในเวลา 1 นาที

2.4 การหา pH optimum

เตรียมสารละลายเซลล์ *Micrococcus lysodeikticus* ใน Miller & Golder buffer pH ต่างๆ จาก pH 4.0-pH 9.0 แล้วตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เหมือนกับการตรวจวัดแอกติวิตีของไลโซไซม์

2.5 การศึกษาสมบัติ thermo stability

นำเอนไซม์จาก crude enzyme และเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เชื้อจากเตรียมไว้แล้ว มาต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำเอนไซม์มาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดแอกติวิตีที่เหลืออยู่ทันที

2.6 การศึกษา storage test

นำไลโซไซม์ที่เตรียมแยกและเอนไซม์บริสุทธิ์มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 วัน นำไปวัดแอกติวิตี ทุกๆ 3 วัน

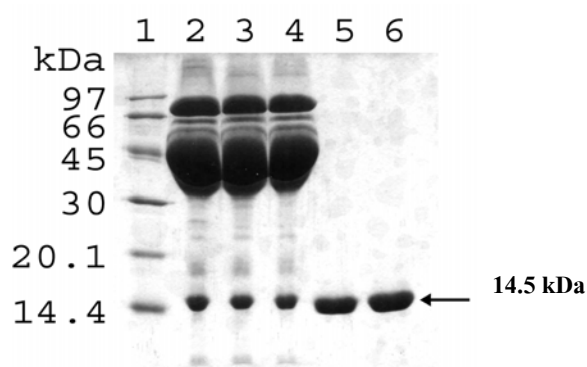
2.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์

สารละลายตัวอย่างทั้งหมดจากการแยกบริสุทธิ์นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970)

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์โดยวิธีมาตรฐานด้วย SDS-PAGE

จากการทำบริสุทธิ์โปรตีนไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีมาตรฐานโดยทำสองคอลัมน์ คอลัมน์แรกจะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบ step wise และคอลัมน์ที่สองจะโปรตีนแบบ linear gradient เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่าไลโซไซม์ที่ทำบริสุทธิ์จากวิธีมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.5 kDa (รูปที่ 1) ได้ไลโซไซม์ประมาณ 146 mg มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 24 เท่า



รูปที่ 1. การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของ purified HEWL ด้วย 12.5 % SDS-PAGE

Lane 1: Marker Lane 2: Crude enzyme

Lane 3: Supernatant ที่ pH4.0

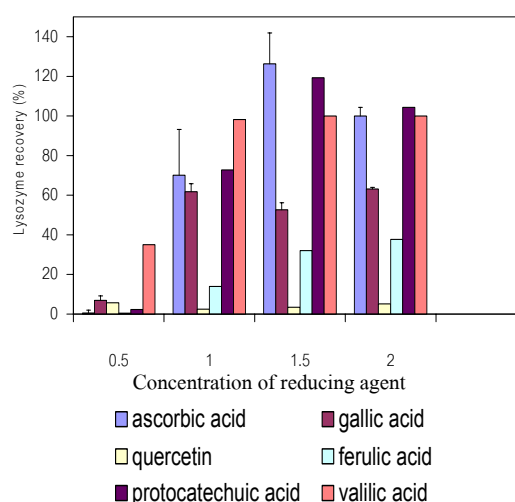
Lane 4: Supernatant ที่ pH7.0

Lane 5: Pooled fraction from step wise

Lane 6: Pooled fraction from linear gradient

3.2 การพัฒนาการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่

3.2.1 การหา reducing agent ที่เหมาะสม

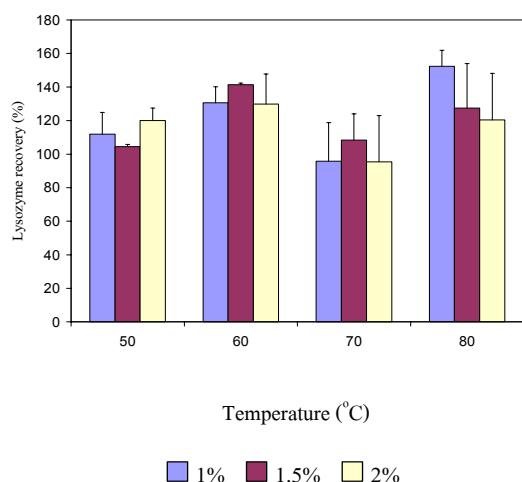


รูปที่ 2. ผลของการเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยใช้ reducing agent ที่ความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5 % และ 2 % ที่อุณหภูมิ 70 °C

จากผลของการเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยใช้ reducing agent ต่าง ๆ พบว่า ascorbic acid, gallic acid, protocatechuic acid และ valilic acid มี % recovery ของไลโซไซม์ที่สูง แต่เราจะเลือกใช้ ascorbic acid เพื่อเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ก่อนแยกในคอลัมน์เนื่องจากราคาไม่แพงและไม่เป็นอันตรายต่อการบริโภค

3.2.2 การหาความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมของ ascorbic acid ในการแยกเตรียมไลโซไซม์

จากผลการทดลองของ reducing agent ที่เหมาะสมพบว่า ascorbic acid เป็น reductant ที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ascorbic acid และอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม โดยใช้ความเข้มข้น 0.5-2% และใช้อุณหภูมิ 50-80 °C

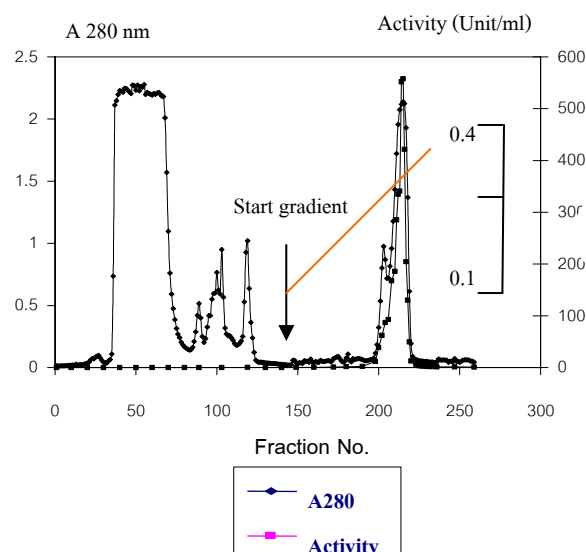


รูปที่ 3. ผลของการเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยใช้ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1% ,1.5% และ 2% ที่อุณหภูมิ 50 °C, 60 °C, 70 °C และ 80 °C ตามลำดับ

ผลของการเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยใช้ ascorbic acid พบว่าความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่เหมาะสมคือ 1.5% และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ก่อนการแยกในคอลัมน์คือ 60 °C เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ recovery ของไลโซไซม์ที่สูงประมาณ 140% (รูปที่ 3)

3.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีนไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่

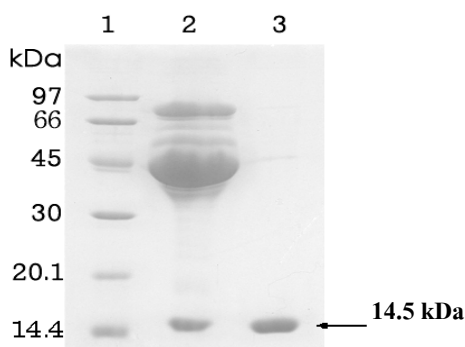
เมื่อได้ reducing agent และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมแยก คือใส่ 1.5% ascorbic acid ลงในสารละลายเจือจางไข่ขาวของไข่ไก่ แล้วนำไปต้มที่ 60 °C เป็นเวลา 5 นาทีปั่นเอาส่วนใสไปแยกต่อด้วย column chromatography ผลของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่โดยชะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบ linear gradient ด้วย 0.05 M Sodium-phosphate buffer pH 7.0 ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.1-0.4 โมลาร์ สามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์และมีแอกติวิตีของไลโซไซม์ได้เพียงฟีดเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4. Elution profile ของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่

จากผลการทำบริสุทธิ์ของ HEWL โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ จากไข่ขาว 50 ml จะได้ไลโซไซม์ทั้งหมดประมาณ 101 mg ซึ่งมี specific activity ประมาณ 139 Unit/mg และได้ % recovery ประมาณ 126% และมีความบริสุทธิ์มากขึ้นถึงประมาณ 15 เท่า

3.4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนไลโซไซม์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ด้วย SDS-PAGE

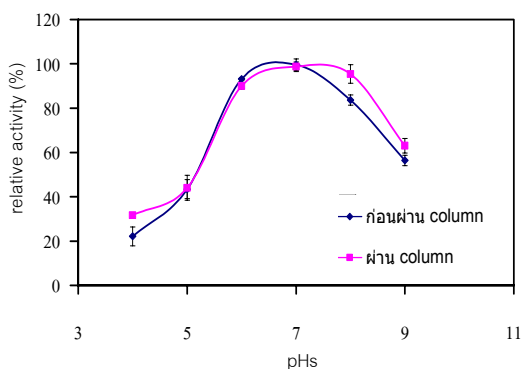


รูปที่ 5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของ purified HEWL ด้วย 12.5 % SDS-PAGE

Lane 1: Marker Lane 2: Crude enzyme
Lane 3: Pooled fraction from linear gradient

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดประมาณ 14.5 kDa ซึ่งตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์ type C จากรูปพบว่า การใช้คอลัมน์ในการแยกทำให้ได้ไลโซไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นกว่าการเตรียมแยก โดยได้ความบริสุทธิ์ถึง 99%

3.5 ผลการศึกษา pH optimum ของ HEWL



รูปที่ 6. การศึกษา pH optimum ของ crude เอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้ว

ผลการศึกษา pH optimum ของเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้ว พบว่า pH optimum ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมี pH อยู่ในช่วงกว้างคือในช่วง pH 6-8 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์กับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้วมีคุณสมบัติเหมือนกันซึ่งเป็นไปได้ว่าการ treated ด้วยสารเคมีและความร้อนไม่มีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์

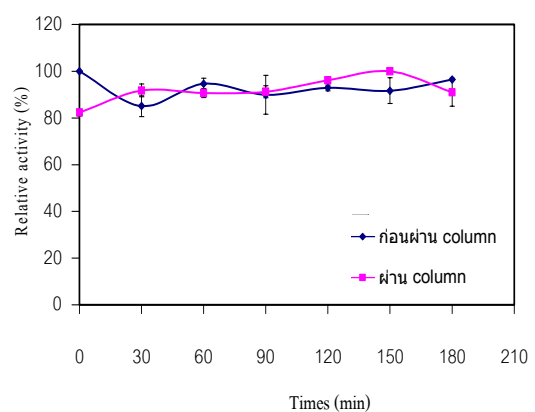
3.6 ผลการศึกษา Storage test ของ HEWL

ผลการศึกษาแอกติวิตี้ที่เหลืออยู่ ของ HEWL ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์และเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้วหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4°C โดยทำการวัดแอกติวิตี้ทุกๆ 3 วันเป็นเวลา 16 วัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์และเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้วยังคงมีแอกติวิตี้เหลืออยู่ เอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องยังคงมีแอกติวิตี้ของไลโซไซม์เหลืออยู่ถึง 79.29% ส่วนเอนไซม์บริสุทธิ์ มีแอกติวิตี้ของไลโซไซม์

เหลืออยู่ 52.94% และเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีแอกติวิตี้เหลืออยู่ 72.79% ส่วนเอนไซม์บริสุทธิ์มีแอกติวิตี้ของไลโซไซม์เหลืออยู่ 55.21%

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไลโซไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์และไลโซไซม์บริสุทธิ์สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4°C ได้อย่างน้อยเป็นเวลา 16 วัน

3.7 ผลการศึกษา thermo stability ของ HEWL



รูปที่ 7. แอกติวิตี้ที่เหลืออยู่ของ HEWL ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้ว เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที

ผลการศึกษาแอกติวิตี้ที่เหลืออยู่ ของ HEWL ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์กับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้ว หลังจากนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์ยังคงมีแอกติวิตี้เหลืออยู่ถึง 96.49% ส่วนเอนไซม์บริสุทธิ์มีแอกติวิตี้เหลืออยู่ 91% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไลโซไซม์มีคุณสมบัติเป็น thermostable enzyme

4. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ โดยเปรียบเทียบสองวิธี คือวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ reducing agent

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยวิธีมาตรฐานกับวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่

	วิธีมาตรฐาน	วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่
1.เวลาที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์	297.12 hr.	145.68 hr.
2.ราคา	comparable	comparable
3.ปริมาณไลโซไซม์ที่ได้	2.79%	8.36%

ที่เหมาะสมคือใช้ 1.5% ascorbic acid ผสมกับไข่ขาว เจือจางแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที วิธีนี้สามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ได้ รวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานถึง 151 ชั่วโมงทำการ และได้ปริมาณไลโซไซม์มากกว่าวิธีมาตรฐานถึง 4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่แยกได้ด้วย SDS-PAGE พบว่าไลโซไซม์ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.5 kDa ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลของ C-type lysozyme และมีความบริสุทธิ์เพียงพอในการนำไปใช้ประโยชน์ ตั้งแต่อุตสาหกรรมอาหารจนถึงอุตสาหกรรมยา ส่วนผลการศึกษา pH optimum พบว่าทั้งเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์และเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์แล้วมี broad pH optimum ในช่วง pH 6-8 เหมือนกัน แสดงว่าการ treated ด้วย ascorbic acid ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และเป็นข้อดีที่จะสามารถนำเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์ไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมหรือในงานด้านต่างๆ ที่ต้องการความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์ที่ไม่มากนัก เช่น อุตสาหกรรมถนอมอาหารโดยใช้ไลโซไซม์เป็นฟิล์มเคลือบผิวผลไม้ เพื่อป้องกันแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจากผลการศึกษา thermo stability ของเอนไซม์ที่เตรียมแยกบริสุทธิ์และเอนไซม์บริสุทธิ์นั้นพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมแยกยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ถึง 96.49% และ 91% สำหรับเอนไซม์บริสุทธิ์ แม้ว่า จะผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานานถึง 3 ชั่วโมง นั้นแสดงว่าไลโซไซม์สามารถทนความร้อนได้

ดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไลโซไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในการผลิต ส่วนผลการศึกษา storage test พบว่าสามารถเก็บไลโซไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C ได้เป็นเวลา 16 วันโดยเอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 50% ซึ่งเป็นผลดีในการใช้ไลโซไซม์ในอุตสาหกรรมถนอมอาหารและพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป

ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานถึง 151 ชั่วโมง ได้ปริมาณไลโซไซม์มากกว่าถึง 4 เท่า มีราคาไม่แพงหากต้องการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์ไปใช้ในทางอุตสาหกรรม เนื่องจาก ascorbic acid หรือวิตามินซีที่ใช้เตรียมเอนไซม์นี้พบได้ในผลไม้ต่างๆ ไป และจากวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ เป็นประโยชน์อย่างมากในการเตรียมแยกและทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ที่บุงร้าง เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ใช้เองในประเทศไทยและยังสามารถพัฒนาเตรียมใช้ไลโซไซม์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงการอุตสาหกรรมสำหรับปัญญาตรี ประจำปี 2546 และได้รับความอนุเคราะห์ใช้ไก่จากบริษัทศรีวิโรจน์ฟาร์ม จ.ขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Jessica, P. Is safer meat packaging in Future ?
In: Nutrition Information & Resource Center.
2002. May :5
- Laemmli, U.K., Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 1970, 277, 680-685.
- Min-Chang, H.; Chuan Yang, C.; Chung Chang, Y.
 Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment.
Agric. Food Chem. 2002 48, 161-164.