บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

1.อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G 27 ของ New Brunswick Scientific Co. Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath shaker) รุ่น 1086 ของ Gesellschaft fur labortechnik (GFL) ประเทศเยอรมัน

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของ Beckmam Industruments Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV/ visible recording spectrophotometer) รุ่น UV-160 A ของ Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Ciba Corning Diagnostics ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องระเหยแห้ง (lyophylizer) รุ่น Eyela FD-1 ของ Tokyo Kikakikai Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HA-36 ของ Hirayama Manufactoring Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น ISSCO BV-128 ของ International Scientific Supply Co., Ltd. ประเทศไทย

ชุดเครื่องกรองเซลล์ (vacuum filtration equipment) รุ่น Sampling Manifold 122S และ แผ่นกรอง (Millipore membrane) ชนิด HA ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องปั๊มสูญญากาศ (vacuum system) รุ่น B 169 ของ Buchi Laboratoriums-technik ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

ชุดเครื่องมือทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel eletrophoresis equipment) รุ่น Mini-protein II dual slab cell ของ Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยการอัดความดันสูง (French pressure) รุ่น 932 ของ Ohtake ประเทศญี่ปุ่น

1.2 เคมีภัณฑ์

กลูโคส (D-(+)-glucose) ของ E. Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) ของ Nacalai tesque Inc. ประเทศญี่ปุ่น

แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) ของ BDH Chemicals จำกัด ประเทศอังกฤษ

แบคโต ทริปโตน (Bacto-tryptone) ของ Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของ Difco laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ของ E. Merck ประเทศเยอรมัน

ลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride) ของ Nacalai tesque Inc. ประเทศญี่ปุ่น

ทริส (Tris buffer (2-amino-2(hydroxymethyl) propane-1-3 diol) ของ Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เฟนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride) ของ Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไลโซไซม์ (lysozyme ; EC. 3.2.1.17) จากไข่ขาวของไก่ ของ Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) ของ BDH Chemicals ประเทศอังกฤษ

โซเดียมเตตราบอเรต (sodium tetraborate) ของ May & Baker ประเทศอังกฤษ

ฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน (fluorodinitrobenzene) ของ Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ของ E. Merck ประเทศเยอรมัน

โปแตสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanine) ของ E. Merck ประเทศเยอรมัน

เฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟต (ferricammonium sulphate) ของ Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

โพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ของ Nacalai tesque Inc. ประเทศญี่ปุ่น

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade)

1.3 เชื้อจุลินทรีย์

1.3.1 *Bacillus subtilis* 168 ใช้ผลิตเอนไซม์ *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase ได้รับความเอื้อเฟื้อมาจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต suita เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น

1.3.2 แบคทีเรียเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ NA-L-alanine amidase และไลโซไซม์ ในการย่อยสลายผนังเซลล์

1.3.2.1 *Micrococcus luteus* TISTR 745 , *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Escherichia coli* TISTR 780 ซื้อมาจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.3.2.2 *Streptococcus faecium* IFO 3128 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ซื้อมาจาก Institute of fermentation เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น

2. การเตรียม NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* 168

2.1 การเตรียมเซลล์ *Bacillus subtilis* 168

ใช้ *Bacillus subtilis* 168 ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen salt medium (Spizizen, 1955) ที่เติมโซเดียมกลูตาเมท มังกานีสคลอไรด์ และ แอล-ทริปโตเฟน

(ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมใน ปริมาตร 1 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะเดิม ติดตามการเจริญ โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (optical density (OD)) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วย เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เก็บเซลล์ระยะการเจริญอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย (late log phase; OD ที่ 650 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0) โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 15,000 g ต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์สองครั้ง

2.2 การเตรียมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์

นำเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 (จากข้อ 2.1) มาแขวนลอยในสารละลาย บัฟเฟอร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เติมเฟนิลเมทิลซัลโฟนิล-ฟลูออไรด์ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 มิลลิโมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์โปรติเอส (protease) ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องอัดความดันสูง (French pressure) ที่ความดัน 1,600 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำ ส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยงแยกเอากากเซลล์ (cell debris) ออกที่ความเร็ว 3,800 g ต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มาปั่นแยกเอาผนังเซลล์ที่ความเร็ว 31,000 g ต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนผนังเซลล์ที่ได้ด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทำซ้ำ 5 ครั้ง ล้างโปรตีนอื่นที่อาจปนเปื้อนอยู่ที่ผนังเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ แล้วทำการสกัด NA-L-alanine amidase ซึ่งเกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ โดยการแขวนลอยผนังเซลล์ ที่เตรียมได้ข้างต้นในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Svarachorn *et. al.* 1989) ปั่นแยกเอาผนังเซลล์ออก เก็บส่วนใสไว้ และเนื่องจาก NA-L-alanine amidase ไม่เสถียรในสารละลายที่มีลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ จึงต้องทำการไดอะไลซีส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซีส ซึ่งยอมให้สารที่มีขนาด น้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 ดาลตันผ่านออกได้ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดร-

คลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ เก็บสารละลายที่ได้หลังกระบวนการไดอะไลซีสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น NA-L-alanine amidase ดิบบริสุทธิ์ในการศึกษาต่อไป

3. วิธีการศึกษาสมบัติของ เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เตรียมได้

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

3.1.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตรแล้วนำมาคำนวณตามสูตร

ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) = $1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$

(ตามที่ Warburg และ Christian , 1941 อ้างถึงใน Dawson *et al.*, 1986)

เมื่อ A_{280} และ A_{260} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร ตามลำดับ

3.1.2 วิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford , 1976) โดยการผสมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร กับสารละลายโคแมสซี่ บริลเลี่ยนบลู จี 250 (ภาคผนวก ข) 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ใช้สารละลายโบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน เป็นสารละลายโปรตีนเปรียบเทียบ คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายโบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (0-100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร) ในปฏิกริยา (ภาคผนวก ง)

3.2 การตรวจพิสูจน์เอนไซม์ดิบบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ว่าเป็น NA-L-alanine amidase

3.2.1 การตรวจหากรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์ โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้

เติมสารละลายฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน จำนวน 60 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ลงในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้ ในสภาวะที่เติมเฟนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 มิลลิ-

โมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส จำนวน 0.6 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.4 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ใช้สารละลายแอล-อะลานินเป็นสารละลายกรดอะมิโนเปรียบเทียบ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนแอล-อะลานิน(0-200 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร) ในปฏิกริยา (ภาคผนวก ง)

3.2.2 การตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้

ผสมสารละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้น 0.05 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสารละลายคาร์บอนเนต-ไซยาไนด์ (ภาคผนวก ข) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงใน 1 มิลลิลิตรของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ที่เตรียมได้ ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีในอ่างน้ำไหลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 g อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาผสมกับสารละลายสี 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในปฏิกริยา (ภาคผนวก ง)

3.3 การหากิจกรรมของเอนไซม์

3.3.1 การเตรียมผนังเซลล์สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้น(substrate)

นำผนังเซลล์ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 2.2 จากปริมาตรเซลล์ตั้งต้น 10 ลิตร เติมลงในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 10 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อทำลายโปรตีนทุกชนิดที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ ล้างผนังเซลล์โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 31,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ 2 ครั้ง และ

น้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (lyophylizer) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์

ผสมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 20 มิลลิกรัม ลงในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมเตตราบอเรต pH 9.5 ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิโมลาร์ที่มีลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 โมลาร์ และเอนไซม์ที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของของผสมข้างต้นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรประมาณ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ข้างต้นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของปฏิกริยาลดลง 0.001 ภายในเวลา 1 นาที ที่สภาวะทดสอบ (Roger *et al.*, 1984)

3.4 การวิเคราะห์ลักษณะและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซีส ชนิดแผ่น (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 7.3x10.3 และ 8.3 x 10.3 เซนติเมตร เข้าด้วยกันโดยสอดแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร เข้าที่ขอบด้านข้างทั้งสองข้าง เทสารละลายผสมเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้นของเจล 10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปในระหว่างแผ่นแก้ว โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ (ภาคผนวก ค) ให้ได้ความสูงต่ำกว่าขอบบนของแผ่นกระจก 5 เซนติเมตร หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที จนกระทั่งเซพาเรตติ้งเจลแข็งตัว เทน้ำออกแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (comb หรือ slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมสแตกกิ้งเจล (stacking gel) (ภาคผนวก ค) โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสแตกกิ้งเจลแข็งตัว ดึงแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ซับช่องใส่ตัวอย่างให้แห้งด้วย

กระดาษกรอง นำแผ่นกระจกที่เตรียมได้นี้ไปประกอบเข้ากับเครื่องเจลอีเลคโตรโฟรีซีส เติมสารละลายบัฟเฟอร์รันนิ่งเจลลงในช่องใส่สารละลายบัฟเฟอร์จนเต็ม ละลายเอนไซม์ที่ต้องการ วิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานในสารละลายบัฟเฟอร์แซมเปิล (ภาคผนวก ข.) ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที หยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่แรงดันกระแสไฟฟ้าคงที่ 50 โวลท์ จนกระทั่งสีของโปรโมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาจนเกือบสุดแผ่นเจล หลังจากทำการอิเลคโตรโฟรีซิส แกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แช่แผ่นเจลลงในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชะล้างสีด้วยสารละลายดีสเตนนิ่ง (ภาคผนวก ข) จะเห็นแถบโปรตีน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนของเอนไซม์ และของแถบโปรตีนมาตรฐาน คำนวนขนาดของเอนไซม์จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และระยะทางที่แถบโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่ได้บนแผ่นเจล

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทดสอบ ซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์แตกต่างกันแตก

ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่จะทดสอบ ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมในปริมาตร 1 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะเดิม ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงกลาง (mid log phase, OD_{650} นาโนเมตร เท่ากับ 0.25) จำนวน 20 มิลลิตร มากรองด้วยชุดเครื่องกรองเซลล์ผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วล้างเซลล์ที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลายที่ต้องการทดสอบ เช่น สารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายเอนไซม์ NA-L-alanine amidase สารละลายไลโซไซม์ สารละลายผสมระหว่าง NA-L-alanine amidase และไลโซไซม์ เป็นต้น ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณอัตราเร็วของเอนไซม์ในการทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกจากสมการ

อัตราการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (k) =

$$\frac{\ln(\text{ความขุ่นเริ่มต้นที่650 นาโนเมตร} / \text{ความขุ่นสุดท้ายที่ 650 นาโนเมตร})}{\text{เวลา (นาที)}}$$