บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้

Psychrotherm incubator shaker model G-27 New Brunswick Scientific Co.Inc. , N.J. , U.S.A.

Psychrotherm incubator shaker model LC-TK Infors , Switzerland.

Incubator shaker model G-25 New Brunswick Scientific Co. Inc. , N.J. , U.S.A.

เครื่องบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท INSI Yamato Scientific Co. , Ltd. , Japan.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร model MD-300 และ ชุดควบคุมสภาวะ model MDIAC-S3 บริษัท B.E. Marubishi , Tokyo , Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Minor 35 MSE บริษัท MSE Ltd.,England.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) model Spectronic 21 บริษัท Bauch & Lomb.,U.S.A.

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation , Tokyo , Japan.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass Works , Corning , N.Y.14830 , U.S.A.

เครื่องแกสโครมาโตรกราฟฟี (Gas chromatography) Hitachi 163 บริษัท Hitachi Ltd. , Tokyo , Japan.

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chromatography,HPLC) LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac บริษัท Shimazu Corporation , Kyoto , Japan.

เครื่องนับเซลเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer) รุ่น meubauer bright line บริษัท Boeco West , Japan.

เครื่องเขย่า(Vortex) Vortex-Genic No.16824 Scientific Industries Inc. , Bohemia , N.Y. 11716 , U.S.A.

กล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11 และกล้องถ่ายรูป Nikon FX-35 A , Nikon Inc. , Instrument Division Garden City , N.Y. , U.S.A.

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Buchi 315 Distillation Unit และ Buchi 425 Digestor บริษัท Buchi Laboratory Techniques Ltd. , Switzerland.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) F-13 , Horiba Ltd. , Japan.

เครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) RE 52 , Yamato , Japan.

1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. เพนิซิลลิน จี (penicillin G sodium)	M & H Manufacturing Co.,Ltd.
2. เพนิซิลลิน วี (penicillin V tablets)	General drug House Co.,Ltd.
3. กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid)	Merck-Schuchardt
4. เฮกซาดีเคน (hexadecane)	Fluka
5. ไตรเอธิลลามีน (triethylamine)	Fluka
6. โปรพานอล (propanol)	Merck
7. เฮกเซน (hexane)	Mallinckrodt
8. เมทธานอล (methanol)	Baker Analyzed
9. กลีเซอรอล (glycerol)	Merck

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากนี้ ซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ส่วน กลูโคส ซูโครส แลคโตส น้ำมันถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง ใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Penicillium chrysogenum* A 88 (85)

เชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ที่ได้รับการกลายพันธุ์ด้วย UV และ NTG ผ่านการคัดเลือกแล้ว จำนวน 4 เชื้อ (86,87)

เชื้อทดสอบ (tested organism) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท M & H Manufacturing Co.Ltd.

2.2 การเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ *Penicillium chrysogenum*

เขี่ยสปอร์ (spore) ของเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเดกซโตรสอาการ์ (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -70 °ซ.

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

เขี่ยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก ลงบนอาหารแข็งเอียง (ภาคผนวกที่ 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 °ซ.

2.3 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อ *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ที่ศึกษา จากที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2.1 ลงใน 1% ทวีน 80 (tween 80) ปริมาตร 2 มล.เพื่อทำให้เป็น

สปอร์แขวนลอย(spore suspension) เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปกระจายบนผิวหน้าอาหารแข็งโพเตโตเดกซโตรสอาการ์ ในขวดแก้วแบนขนาด 10x15x4 ซม.^{3} บ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ. นาน 7 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์เต็มที่ จากนั้นจึงถ่ายสปอร์ออกจากขวด โดยการล้างด้วย 1% ทวีน 80 ปริมาตร 20 มล. กรองผ่านผ้าขาวบางหนา 4 ชั้นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer)

2.3.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เขี่ยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p จากที่เก็บรักษาไว้ตามวิธีการทดลองที่ 2.2.2 ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 50 มล. บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ. ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูงในขวดรูปชมพู่

ถ่าย 1 มล. ของสปอร์แขวนลอย ที่มีความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์/มล. ที่เตรียมได้ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารที่ใช้สำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ. ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกที่ละลายในน้ำเข้มข้น 1.25 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 2 มล. คิดเป็น 0.5 กรัม/ลิตรของอาหารที่ใช้ในการหมัก

2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี

ถ่าย 1 มล. ของสปอร์แขวนลอย ที่มีความเข้มข้น $2.5x10^7$ สปอร์/มล. ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 2.3.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.4) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 28 °ซ. ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที นาน 60 ชม.

2.3.5 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ในขวดรูปชมพู่

ถ่าย 5 มล. ของหัวเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 2.3.4 ลงใน 50 มล. ของอาหารที่ใช้ในการผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.5) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 28 °ช. ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาการหมักเท่ากับ 48 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกที่ละลายในน้ำเข้มข้น 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 2 มล. คิดเป็น 0.8 กรัม/ลิตรของอาหารที่ใช้ในการหมัก

2.3.6 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีในข้อ 2.3.4 ให้ได้ปริมาตรรวม 350 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.5) ปริมาตร 3150 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 28 °ช. อัตราการให้อากาศเป็น 1 vvm. โดยไม่ต้องควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอล(silicone adecanol) เป็นสารกำจัดฟอง เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 2.8 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 200 มล. โดยความเข้มข้นที่เติมไปทั้งหมดคิดเป็น 0.8 กรัม/ลิตรอาหาร

3. <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

3.1 <u>การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา</u> (bioassay) (80)

เจือจางเชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 15% ของการคายแสง (transmittance) โดยการวัดที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร แล้วนำมาเจือจางอีก 20 เท่า ปิเปตปริมาตร 0.4 มล.ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ(petridish) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 20 มล. อุณหภูมิ 50 °ช. ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 50 มล. หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปมาเพื่อให้เชื้อทดสอบกระจายทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที บนพื้นที่ปรับให้เสมอ ใช้เหล็กเจาะ (steel cork borrer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 หลุม จากนั้นทำการหยอดสารตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางด้วย 1 % ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยใช้ไมโครปิเปตลงในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้เพนิซิลลิน จี

แพร่กระจายไปรอบ ๆ หลุม แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อทดสอบเจริญได้เต็มที่ นำมาวัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม เจือจางใน 1 % ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ให้มีความเข้มข้น 1-7 หน่วย/มล. นำไปหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยาดังที่กล่าวแล้วข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของความเข้มข้นเพนิซิลลิน จี กับ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวกที่ 5.1

3.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC</u> (High Performance Liquid Chromatography) (84)

นำสารตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่อง microcentifuge ด้วยความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เอาเฉพาะส่วนใสปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายเพนิซิลลิน วี เข้มข้น 5 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 มล. แล้วเติมสารละลายตัวพาอีก 8 มล. เขย่าให้เข้ากัน ฉีดสารละลายตัวอย่างนี้ 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์ (column)	Zorbax C-8
สารละลายตัวพา (mobile phase)	55 มล.ของ 50 mM KH_2PO_4 ปรับ pH 5.0 ด้วย KOH : methanol 45 มล.
อัตราการไหล (flow rate)	1.2 มล./นาที
ความดัน (pressure)	180-200 กก./ซม.^{2}
อุณหภูมิ (temperature)	25 °ซ.
เครื่องตรวจวัด (detector)	UV ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

ด้วยสภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเพนิซิลลิน จี โซเดียม ประมาณ 8 นาที และของเพนิซิลลิน วี ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานประมาณ 13 นาที ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ เพนิซิลลิน จี โซเดียม เข้มข้น 1-5 กรัม/ลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี และเพนิซิลลิน วี กับความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี โซเดียม แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวกที่ 4.1

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (88)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) 1 มล. ลงในสารตัวอย่างที่เจือจางจนเหมาะสมแล้ว ปริมาตร 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก./มล. ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดเกลียวขนาด 20 มล. เติมสารละลายกรดเกลือ 1.2 นอร์มอล ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปสลายพันธะ (break bond) ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ตามวิธีในข้อ 3.3.1

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (ammonia nitrogen) ด้วยเครื่องกลั่น Buchi 315

นำสารตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ทำการกลั่นจับแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้น โดยใช้ 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) ปริมาตร 100 มล. ใช้อินดิเคเตอร์ (indicator) 3 หยด (ภาคผนวกที่ 2.3.2) กลั่นจนสารละลายกรดบอริก มีปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้มาติเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว โดยที่

% แอมโมเนียไนโตรเจน = ปริมาตรกรดเกลือ x ความเข้มข้นของกรดเกลือ x 1.4
ปริมาตรของสารตัวอย่าง

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (total nitrogen) โดยวิธี Micro-Kjeldahl (89)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มล.ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มล.เติมเกลือผสม (ภาคผนวกที่ 2.3.1) 7 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น ปริมาตร 15 มล. แล้วนำไปย่อยบนเตาหลุม (digester) ด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปกลั่นเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.4.1 โดยที่

% ไนโตรเจนรวม = ปริมาตรกรดเกลือ x ความเข้มข้นของกรดเกลือ x 1.4
ปริมาตรของสารตัวอย่าง

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก (90)

นำสารตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดแทนนิค (tannic acid) 0.05 กรัม เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นแยกเอาตะกอนทิ้ง ดูดเอาสารละลายใส 2 มล. มาปรับให้ pH เป็น 1-2 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น เติมสารเปรียบเทียบเฮกซาดีเคน เข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มล. ปริมาตร 0.5 มล. และเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อขจัดน้ำ สกัดของผสมทั้งหมดด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) ปริมาตร 10 มล.เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นาน 60 วินาที หลังจากนั้นนำชั้นไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 5 มล. มาเติมไตรเอทิลเอมีน (triethylamine) ปริมาตร 0.5 มล. แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 °ซ. เตรียมเกลือฟีนิลอะซิเตต ให้อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยเติมสารละลายโปรพาโนลิก-ไฮโดรคลอริก (propanolic-HCL) เข้มข้น 2.2 นอร์มัล (ภาคผนวกที่ 2.4) ปริมาตร 1 มล. บ่มของผสมนี้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วสกัดโปรพิลฟีนิลอะซิเตตนี้ (propylphenylacetate) ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 มล. และน้ำปริมาตร 1 มล. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่านาน 30 วินาที นำชั้นของเฮกเซนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี ดังนี้

ฉีดสารละลายในชั้นเฮกเซน 2 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Hitachi 163) โดยมีสภาวะดังนี้

ขนาดคอลัมน์แก้ว (glass column size)	3 มม. x 1 ม.
ตัวดูดซับ (absorbent)	chromosorb WAW 80/100 mesh เคลือบด้วย silicone SE-30
อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature)	150 °ซ.
อุณหภูมิของตำแหน่งที่ฉีดตัวอย่าง (injection temperature)	160 °ซ.
แกสตัวพา (carrier gas)	แกสไนโตรเจน ความดัน 1.4 กก./ซม.^{2}
เครื่องตรวจวัด (detector)	เฟรมไอออไนเซชั่น (flame ionization detector)

โดยเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดฟีนิลอะซิติก ประมาณ 0.8 นาที และสารเปรียบเทียบ เอกซาดิเคน ประมาณ 4 นาที คำนวณหาปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดฟีนิลอะซิติก เข้มข้น 50-600 ไมโครกรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.4) นำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกรดฟีนิลอะซิติกและสารเปรียบเทียบ กับความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติก แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวกที่ 7

3.6 <u>การวัดการเจริญของเชื้อรา โดยวิธีหาน้ำหนักเซลแห้ง</u>

นำสารตัวอย่าง ปริมาตร 25 มล.มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่อบแห้งจนทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว แยกส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ ส่วนที่เป็นเซลนำมาล้างด้วย กรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัล(normal) ปริมาตร 50 มล. แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 1 วัน ชั่งน้ำหนักเซลแห้ง