บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1. อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้

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

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

Aquartherm water bath shaker model G-86 New Brunswick Scientific Co.Inc., N.J., U.S.A.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร model MD-300 และชุดควบคุมสภาวะ บริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) model Minor 35-MSE บริษัท MSE., England.

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

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (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.

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

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genie 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 Labotary-Techniques Ltd., Switzerland.

1.2 <u>สารเคมี</u>

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn steep liquor)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
2.เพนนิซิลิน จี (penicillin G Sodium)	Merck Sharp & Dohme (Thailand) Ltd.
3.กรดฟีนิลอะซีติก (phenylacetic acid)	E.Merck Damstadt , Germany.
4.เฮกซาดีเคน (Hexadecane)	Fluka , Switzerland.
5.ไตรเอทิลลามีน (triethylamine)	E.Merck Damstadt , Germany.
6.โปรพานอล (propanol)	May & Baker Ltd. Dagenham , England.
7.เฮกเซน (Hexane)	E.Merck Damstadt , Germany.
8.เมทธานอล (Methanol)	E.Merck Damstadt , Germany.

สารเคมีอื่นๆที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท B.D.H. ประเทศอังกฤษ บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ส่วนกลูโคส ซูโครส แลคโตส น้ำมันถั่วเหลือง และ เอทธานอล ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา Penicillium chrysogenum A 88

เชื้อที่ใช้ทดสอบ (test microorganism) Staphylococcus aureus ATCC 6538 P. (14) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Merck Sharp & Dohme (ประเทศไทย) จำกัด

2.2. การเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1. การเก็บรักษาเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

เชื้อสปอร์(spore)ของเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar,PDA ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง(deep freeze)อุณหภูมิ -70 °ซ.

2.2.2. การเก็บรักษาเชื้อ Staphylococcus aureus ATCC 6538 P.

เชื้อเชื้อ Staphylococcus aureus ATCC 6538 P. โดยใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) (ภาคผนวกที่ 1.2.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง(deep freezer)อุณหภูมิ -70 °ซ.

2.3. การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1. การเตรียมสปอร์

เชื้อสปอร์ของเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2.1.ลงในสารละลาย 0.1% โพลีเปปโตน เพื่อทำให้เป็นสปอร์แขวนลอย(spore suspension)ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปกระจายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ในขวดแก้วขนาด 10x15x4 ซม.^{3} บ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ. นาน 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยการล้างด้วยสารละลาย 0.1% โพลีเปปโตน ปริมาตร 20 มล. แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

2.3.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ (test microorganism)

เขี่ยเชื้อ Staphylococcus aureus ATCC 6538 p. จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตาม ข้อ 2.2.2 ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ° ซ. ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 - 24 ชม.

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เพื่อให้ผลิตเพนนิซิลิน จี ในขวดรูปชมพู่

ถ่าย 1 มล. ของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่มีความเข้มข้น 5 x 10^6 สปอร์ต่อมล. ที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.3.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.4 , 1.5) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ psycrotherm incubater shaker ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที เมื่อเชื้อมีอายุ 48 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซีติกที่ละลายในน้ำเข้มข้น 1.25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 2 มล.

2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่าย 1 มล. ของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่มีความเข้มข้น 2.5 x 10^7 สปอร์ต่อมล. ที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.3.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.

นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ psycrotherm incubater shaker ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 36 ชม.

2.3.5 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เพื่อให้ผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.4 ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.6 , 1.7) ปริมาตร 2.7 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวแล้วจึงเริ่มต้นการหมัก โดยใช้อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/1 ลิตรของปริมาตรอาหาร/นาที ใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอล (silicone adecanol) เป็นสารกำจัดฟอง (antifoamer) ควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ. ตลอดการหมัก ควบคุมระดับความเป็นกรดด่างให้อยู่ระหว่าง 5.8 ถึง 7.1 โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเชื้อมีอายุ 24 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซีติกที่ละลายในน้ำ เข้มข้น 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ครั้งละ ปริมาตร 25 มล. โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชม. จนสิ้นสุดการหมัก รวมเวลาการหมัก 144 ชม. (รูปที่ 4)

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

เตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. สูง 1.5 ซม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจือจางเชื้อที่เตรียมตามข้อ 2.3.2 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 25% ของการคายแสง (transmittance) โดยการวัดที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร แล้วเจือจางอีก 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำเชื้อที่เตรียมได้นั้น ปริมาตร 0.4 มล. ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 20 มล. ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแข็งแล้วใช้เหล็กเจาะ (steel cork borrer) ขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 หลุม จากนั้นหยอดสารตัวอย่างโดยใช้ไมโครปิเปต ลงในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้สารตัวอย่างแพร่กระจาย (diffuse) ไปในอาหาร จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. แล้ววัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น (รูปที่ 5) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเพนนิซิลิน จี โดยเทียบกับกราฟมาตราฐาน

ทำกราฟมาตราฐานโดยใช้เพนนิซิลิน จี โซเดียม เจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ให้มีความเข้มข้น 1 - 7 หน่วย/มล. แล้วนำไปหาปริมาณเพนนิซิลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา ดังที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างค่าลอกการิธึม (logarithm) ของความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี กับ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

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

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water) ฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC (Shimadzu APLC , LC-3A) โดยมีสภาวะดังนี้

Column	: Sorbex C-18 25 cm.x 4.6 mm. ID.
Mobile phase	: 13% methanol
Flow rate	: 1 ml./min
Pressure	: 120-180 kg/cm^2
Temperature	: 25 °C
Detector	: UV. wavelength 240 nm.
Attenunation	: 0 mv/full scale
Chart speed	: 1.5 mm./min

ด้วยสภาวะดังกล่าวเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเพนนิซิลิน จี โซเดียมเท่ากับ 4 นาที ทำกราฟมาตราฐานโดยใช้เพนนิซิลิน จี โซเดียมเข้มข้น 0.5 - 3.0 ไมโครกรัม และฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนนิซิลิน จี กับความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี

3.3 <u>การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก</u>

นำตัวอย่างปริมาตร 5 มล. มาตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดแทนนิค (tannic acid) 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เซนติฟิวส์แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 2 มล. มาปรับความเป็นกรดด่าง ให้มีพี เอช เป็น 1-2 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น เติมสารละลายมาตราฐาน เฮกซาดีเคน (hexadecane) เข้มข้น 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.5 มล. และเติมโซเดียมคลอไรด์เพื่อขจัดน้ำ สกัดของผสมทั้งหมดด้วยไดเอทธิลอีเทอร์ (diethylether) ปริมาตร 10 มล. ในหลอดเกลียวขนาด 15 มล. นำมาเขย่าอย่างแรงบนเครื่องเขย่า (Vortex mixer) เป็นเวลา 60 วินาที นำชั้นของไดเอทธิลอีเทอร์ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 5 มล. เติมไตรเอทิลามีน (triethylamine) ปริมาตร 0.5 มล. ระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เตรียมเกลือของฟีนิลอะซีเตรท ที่สกัดได้นี้ให้อยู่ในรูปเอสเทอร์ โดยการเติมสารละลายโปรพาโนลิก - ไฮโดรคลอริก (propanolic-HCL) เข้มข้น 2.2 นอร์มัล (normal) (ภาคผนวกที่ 2.4) ปริมาตร 1 มล. ลงในสารที่สกัดได้และทำให้แห้งแล้ว บ่มของที่ผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที สกัดโปรพิล ฟีนิลอะซีเตรท (propyl phenylacetrate) ที่เกิดขึ้น โดยการเติมเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 1 มล. และน้ำปริมาตร 1 มล. นำมาเขย่าอย่างแรงบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 วินาที นำชั้นของเฮกเซนไปวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก โดยวิธีแกสมาโตกราฟฟี (31) ดังต่อไปนี้

ฉีดสารละลายในชั้นของเฮกเซน 2 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Hitachi 163) โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์แก้ว ขนาด (glass column size) : 3 มม. x 1 ม.

ตัวดูดซับ (absorbent) : โครโมซอบ (chromosorb) WAW ขนาด 80/100 เมช (mesh) เคลือบด้วยซิลิโคน (silicone SE-30)

อุณหภูมิคอลัมน์ (column tenperature) : 150 °ซ.

อุณหภูมิตำแหน่งที่ฉีดตัวอย่าง (injection temperature) : 160 °ซ.

แกสตัวพา (carrier gas) : แกสไนโตรเจน ด้วยความดัน 1.4 กก./ซม.^{2}

เครื่องตรวจวัด (detector) : เฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector)

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดฟีนิลอะซีติก 1.4 นาที และสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ 5 นาที

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดฟีนิลอะซีติก เข้มข้น 50 - 600 ไมโครกรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.6) นำไปผ่านขบวนการสกัด การเตรียมอนุพันธ์ และฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟี ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของกรดฟีนิลอะซีติกและสารละลายมาตรฐาน กับความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (ammonia nitrogen) ด้วยเครื่องกลั่น (Buchi 315)

นำตัวอย่างปริมาตร 10 มล. ใส่ในขวดกลั่น ขนาด 300 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 37% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มล. ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (indicator) (ภาคผนวกที่ 2.3.2) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริก มีปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้มาติเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 2.3.3) โดยที่

$$\text{ร้อยละของแอมโมเนียไนโตรเจน} = \frac{\text{ปริมาตรติเตรทของตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน} \times 1.4}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl

ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม หรือปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมของผสมของเกลือ (ภาคผนวกที่ 2.3.1) 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้น ปริมาตร 15 มล. นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่อง Buchi 425 จนได้สารละลายใสในตู้ควัน ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทำตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยที่

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตรติเตรตของตัวอย่าง x ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน x 1.4}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

3.5 <u>การวิเคราะห์ซัลเฟต</u> (32 , 33)

นำตัวอย่างปริมาตร 20 มล. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่น 130 มล. และเติมกรดเกลือเข้มข้น 3 นอร์มอล ปริมาตร 2 มล. ค่อยๆ เติมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) เข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มล. ลงในส่วนผสมข้างต้น โดยให้ความร้อนพอประมาณ และกวนเบา ๆ ตลอดเวลา โดยใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) กวนส่วนผสมนั้นต่อไปอีก 15 นาที จากนั้นกรองตะกอนผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ล้างตะกอนด้วยน้ำอุ่น 5 ครั้ง จนหมดอิออนคลอไรด์ (ทดสอบโดยเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 3 มล.) นำกระดาษกรองที่มีตะกอนวางในถ้วยครูซิเบิล (crucible) ที่ทราบน้ำหนัก นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 800 °ซ. นาน 1 ชม. ชั่งน้ำหนักตะกอน โดยที่

$$\text{ร้อยละซัลเฟต} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน}(BaSO_4) \times 0.412 \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

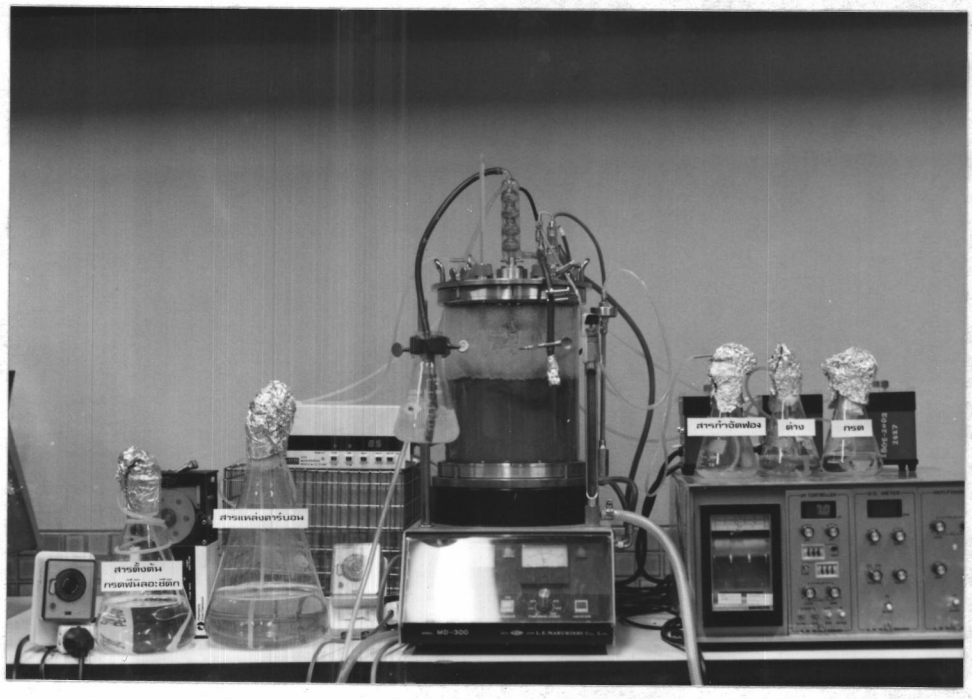
3.6 <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (34)</u>

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) 1 มล. ลงในตัวอย่าง ปริมาตร 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

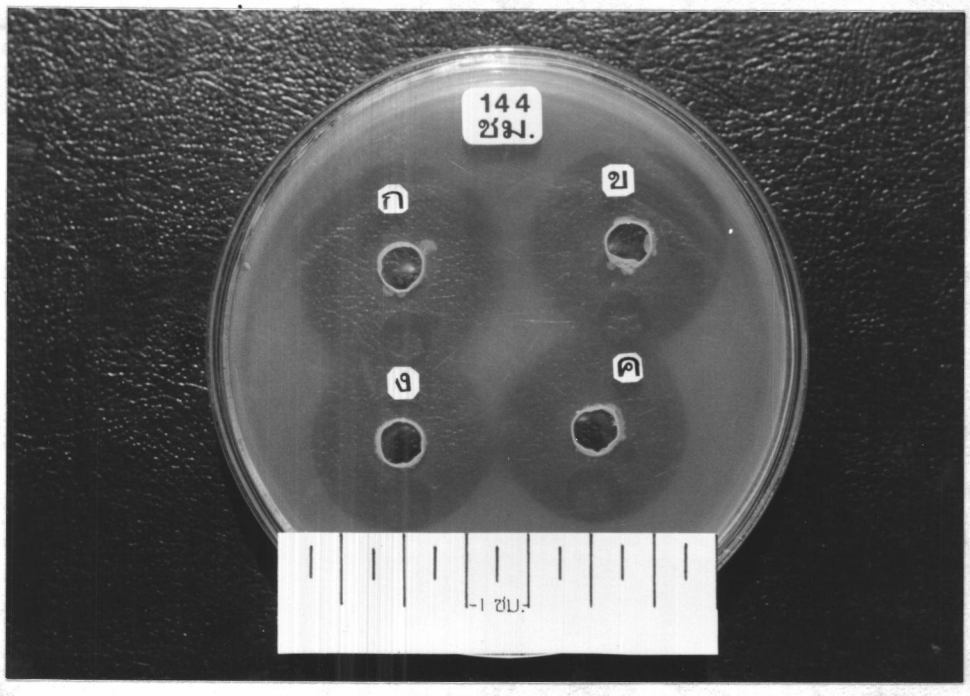
ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

3.7 การวัดการเจริญของเชื้อรา Penicillium chrysogenum A 88 โดยวิธีหาน้ำหนักเซลแห้ง

นำตัวอย่างปริมาตร 25 มล. มากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนัก เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลออกจากส่วนน้ำใส ล้างเซลด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 50 มล. (35) แล้วล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. ชั่งน้ำหนักเซลแห้ง



รูปที่ 4 แสดงการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 5 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น จากการวิเคราะห์หาปริมาณ เพนนิซิลิน จี โดยวิธี bioassay ที่เวลา 144 ชม. ของการหมัก

ก. dilution 400 เท่า
ข. dilution 600 เท่า
ค. dilution 800 เท่า
ง. dilution 1000 เท่า