บทที่ ๓

การทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๓.๑ เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการหมักประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังรูป ๒ ซึ่งแบ่งออกเป็น ๓ ส่วนใหญ่ ๆ คือ

๑. เครื่องพ่นอากาศและตัวกระจายอากาศ

๒. คอลัมน์สำหรับหมักและระบบกันล้น

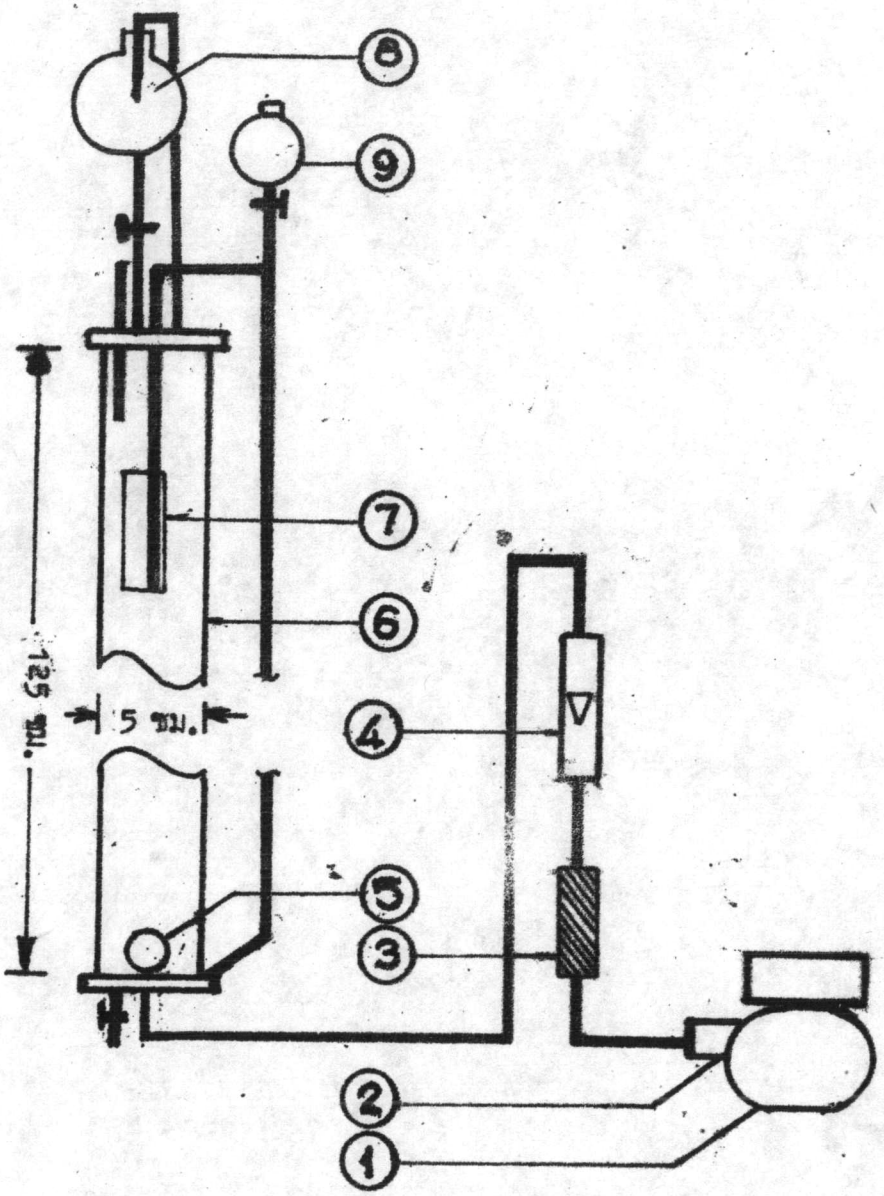
๓. ระบบการป้อนย้อนกลับ

๓.๑.๑ เครื่องป้อนอากาศและตัวกระจายอากาศ

ประกอบด้วยเครื่องอัดอากาศ (หมายเลข ๑) ซึ่งจะให้อัตราการไหลของอากาศคงที่โดยมีเครื่องปรับความดัน (หมายเลข ๒) ติดอยู่กับตัวเครื่อง อากาศจะไหลผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศ (หมายเลข ๓) และเข้าเครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ (หมายเลข ๔) แล้วผ่านเข้าตัวกระจาย (หมายเลข ๕) ซึ่งตั้งอยู่ตอนล่างของคอลัมน์ ตัวกระจายอากาศทำด้วยเซรามิกส์กลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๒.๕ เซ็นติเมตร สามารถปรับให้สูงต่ำได้ตามต้องการ

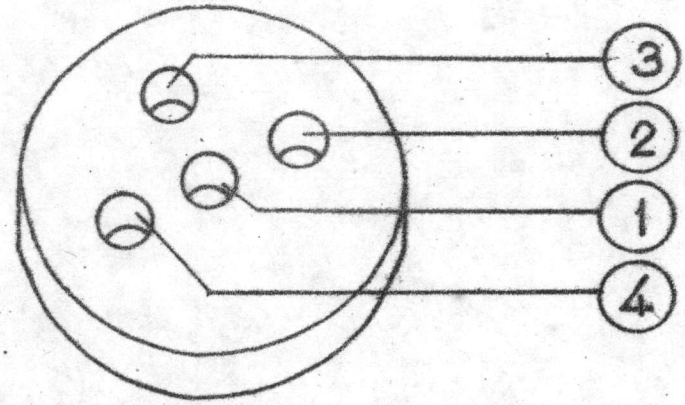
๓.๑.๒ คอลัมน์สำหรับหมักและระบบกันล้น

คอลัมน์ที่ใช้หมักมี ๒ ขนาดคือ ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ สำหรับการหมักแบบไม่ต่อเนื่องใช้คอลัมน์เล็กเพียงคอลัมน์เดียว ตัวคอลัมน์ (หมายเลข ๖) ทำด้วยพลาสติกส์ใสชนิดทนต่อสารเคมีได้ดี ไม่บิดงอเมื่อถูกความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ๕ เซ็นติเมตร สูง ๑๒๕ เซ็นติเมตร มีความจุ ๒๕๐๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปลายบนปิดและเจาะเป็นรูเท่า ๆ กัน ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๐.๘ เซ็นติเมตร ๔ รู (รูปที่ ๓) รูที่ ๑ ใช้สำหรับต่อท่อในระบบการป้อนย้อนกลับ (หมายเลข ๗) รูที่ ๒ สำหรับให้ฟองที่ล้นออกแล้วไหลย้อนกลับเข้าสู่ระบบกันล้น (หมายเลข ๘) และไหลกลับเข้าสู่คอลัมน์

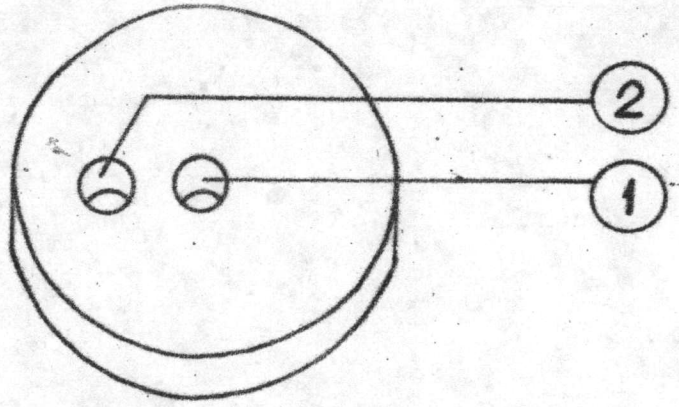


รูปที่ ๒ แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมัก

๑. เครื่องอัดอากาศ
๒. เครื่องปรับความดัน
๓. เครื่องกรองอากาศ
๔. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
๕. ตัวกระจายอากาศ
๖. ตัวคอลัมน์
๗. ระบบไหลป่วนย้อนกลับ
๘. ระบบกันล้น
๙. กระเปาะสำหรับเติมอาหารเหลว

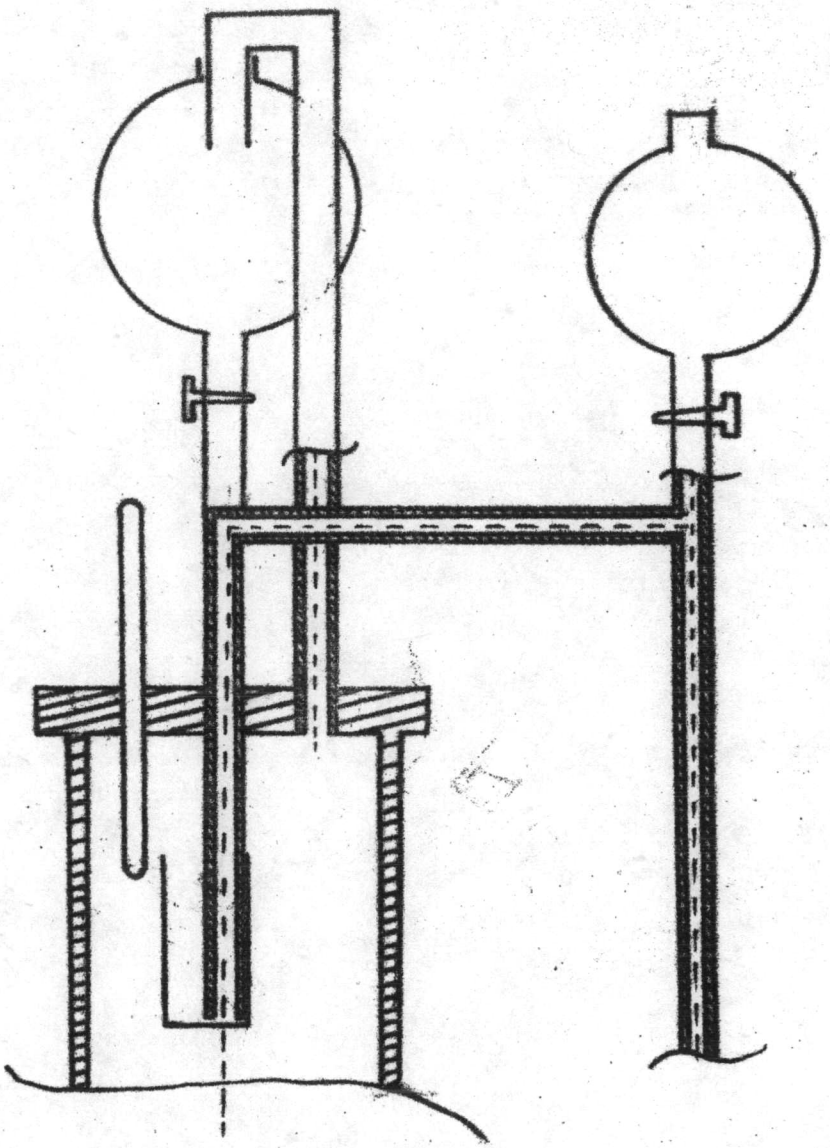


ฝาปิดตอนบน

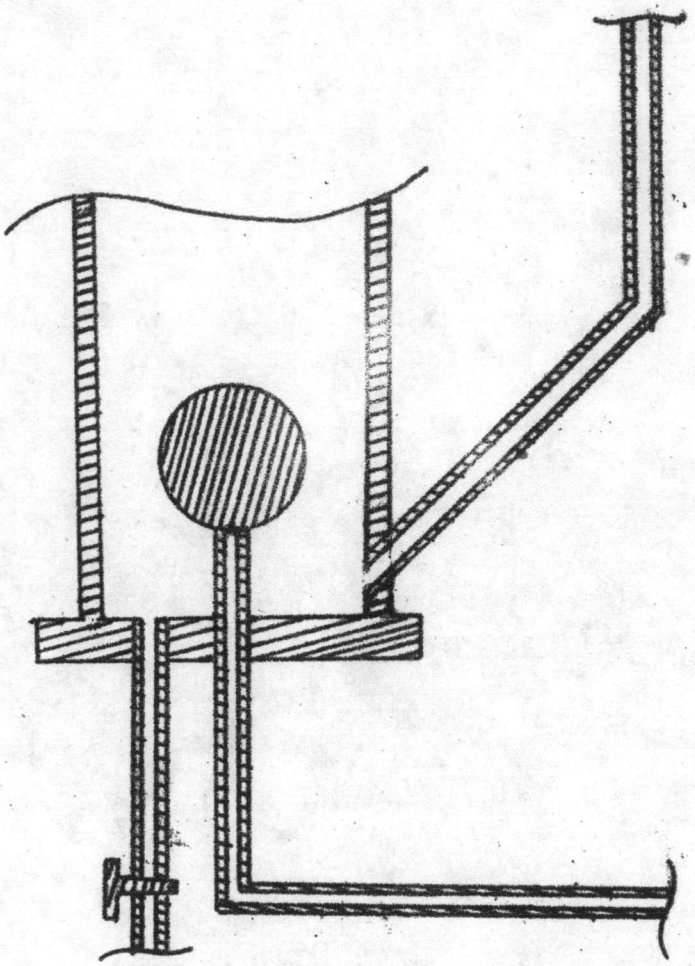


ฝาปิดตอนล่าง

รูปที่ ๓ แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของรูที่เจาะบนฝาปิด



รูปที่ ๔ แสดงระบบการป้อนย้อนกลับและระบบการกันล้น



รูปที่ ๕ แสดงหัวกระจายอากาศและท่อป้อนย้อนกลับทางส่วนล่างของคอลัมน์

ในรูปที่ ๓ รูที่ ๔ สำหรับเสียบเทอร์มอมิเตอร์ เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในคอลัมน์ที่ปลายล่างของคอลัมน์ปิดและเจาะรูขนาดเดียวกันไว้ ๒ รู (รูปที่ ๓) รูแรกสำหรับติดตั้งตัวกระจายอากาศ (หมายเลข ๕) รูที่ ๒ มีท่อต่อออกและมีก๊อกปิดเปิดที่ปลายท่อเพื่อใช้ในการชักตัวอย่างและถ่ายผลิตภัณฑ์ออกภายหลังการหมัก สำหรับการหมักชนิดกึ่งต่อเนื่องใช้ทั้งคอลัมน์เล็กและคอลัมน์ใหญ่ ตัวคอลัมน์ใหญ่ทำด้วยแก้ว มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ๑๐ เซ็นติเมตร สูง ๑๒๕ เซ็นติเมตร และมีความจุ ๑๐,๐๐๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร มีระบบต่าง ๆ เช่นเดียวกับคอลัมน์เล็ก

๓.๑.๓ ระบบการป้อนย้อนกลับ

การป้อนย้อนกลับทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของน้ำหมักระหว่างตอนล่างและตอนบนของคอลัมน์ และในคอลัมน์กับท่อป้อนย้อนกลับที่ฝาปิดปลายบนของคอลัมน์จะมีท่อขนาดเดียวกับรูหมายเลข ๑ แต่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ๐.๖ เซ็นติเมตร เสียบอยู่ และที่ปลายของท่อนี้จะยึดติดกับถ้วยพลาสติกส์ทนกรด (รูปที่ ๔) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง ๒ เซ็นติเมตร สูง ๖ เซ็นติเมตร ถ้วยนี้จะทำหน้าที่กันไม่ให้อากาศไหลเข้าท่อป้อนย้อนกลับ ซึ่งถ้ามีอากาศอยู่จะทำให้การไหลชงักได้ ท่อนี้จะยื่นลงมาลึก ๒๐ เซ็นติเมตร ส่วนที่โผล่จากฝาปิดด้านบนของตัวคอลัมน์จะเป็นท่อที่งอและจะแยกออกเป็น ๒ ทาง ทางหนึ่งติดกับขวด (หมายเลข ๔) สำหรับทำให้เริ่มเกิดการย้อนกลับ ส่วนอีกทางหนึ่งขนานกับตัวคอลัมน์ลงมาจนถึงฐานและเจาะทะลุเข้าตัวคอลัมน์ตรงรอยต่อระหว่างตัวคอลัมน์กับฝาปิดด้านล่าง รูปที่ ๔,๕ แสดงถึงระบบกันล้นและระบบป้อนย้อนกลับตอนบน และตัวกระจายอากาศ และตอนล่างของท่อป้อนย้อนกลับ

๓.๒ การทดสอบเบื้องต้น

เนื่องจากเครื่องหมักที่สร้างขึ้นมีระบบไหลหมุนเวียนของน้ำหมักผ่านท่อป้อนย้อนกลับ โดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของน้ำหมักในคอลัมน์ เมื่อฟองอากาศเข้ากับท่อป้อนย้อนกลับซึ่งไม่มีอากาศเข้าไป ความแตกต่างดังกล่าวมากน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของอากาศที่ป้อนเข้าไป ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการป้อนอากาศกับอัตราความเร็ว

ในการไหลหมุนเวียนของน้ำหมักผ่านท่อป้อนย้อนกลับ ดังแสดงในตารางที่ ๑

๓.๓ การทำให้ปราศจากเชื้อ

การหมักเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์คุณภาพดี ปริมาณการปลิตสูง ควรจะทำให้ระบบการหมักอยู่ในสภาพที่ปลอดจากเชื้อตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ และทำให้เชื้อตัวที่จะเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพที่สามารถแข่งขันกันไม่ให้เชื้อตัวอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่เจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อที่จะเพาะเลี้ยงได้ การศึกษาทดลองนี้ได้จัดสภาพการหมักให้ปลอดเชื้อดังนี้

๑. ฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่จะเลี้ยงเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน ๑๕ นาที

๒. อบฆ่าเชื้อในเครื่องมือ เครื่องใช้ก่อนที่จะใช้ถ่ายเชื้อหรือเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นด้วยความร้อนแห้งอุณหภูมิประมาณ ๑๒๐ องศาเซลเซียส นาน ๑/๒ ชั่วโมง

๓. การทำคอลัมน์ให้ปราศจากเชื้อ ทำโดยล้างด้วยผงซักฟอก น้ำ และสารละลายฟีนอล (Phenol solution) ๕% ปริมาตร/ปริมาตร

๔. จัดสภาพการหมักให้เหมาะสมกับเชื้อยีสต์จะเจริญได้ดี และเป็นสภาพที่เชื้ออื่น ๆ เจริญแข่งขันไม่ได้ โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ในตอนเริ่มต้นสูง เมื่อวัดสภาพการดูดกลืนแสง (absorbance) และปรับสภาพของน้ำหมักให้มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ ๔ อุณหภูมิ ๒๘ องศาเซลเซียส ถึง ๓๒ องศาเซลเซียส (Kihlberg,R.1972)

๕. สารขจัดฟอง (๑๐% ซิลิโคน) จะฆ่าเชื้อที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที ก่อนนำไปใช้

006596

๓.๔ ขั้นตอนในการทดลอง

๓.๔.๑ เชื้อ แคนดิดา ยูติลิส ของกองวิทยาศาสตร์ ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์ ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ใน มอลต์ อาการ์ (malt agar) เก็บไว้ในตู้เย็น นำออกมาเพาะชำที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส นาน ๒ วัน แล้วเตรียมถ่ายลงใน โปเตโต เดกโตรส อาการ์

i 18306652

๓.๔.๒ โปเตโต เดกโตรส อาการ์ ประกอบด้วย โปเตโต ๒๐๐ กรัม แบทโต-เดกโตรส ๒๐ กรัม และ แบทโต อาการ์ ๑๕ กรัม นำมาละลายน้ำในอัตราส่วน ๓๙ กรัม/น้ำ ๑๐๐๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ต้มให้ร้อนจนละลายหมด ทำให้มีระดับความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ ๕ ด้วยกรด ทาร์ทาริก ใส่ลงในหลอดแก้ว แล้วฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น ๑๒๑ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที นำหลอดมาวางเรียงเมื่อวุ้นแข็ง แล้วนำเข้าเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อไว้ใช้ต่อไป

๓.๔.๓ ถ่ายเชื้อตาม (๓.๔.๑) ลงในอาหารวุ้น ๓.๔.๒ แล้วเพาะชำที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่เลี้ยงไว้นี้ลงในอาหารวุ้นหลอดใหม่ เลี้ยงเพาะชำต่อไปอีก ๒๔ ชั่วโมง เตรียมถ่ายลงในอาหารเหลวน้ำสัปปะรด

๓.๔.๔ อาหารเหลวน้ำสัปปะรด เตรียมโดย เอาสัปปะรดทั้งลูกมาปอกเปลือก แล้วสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ คั้นเอาน้ำออกด้วยเครื่องบีบ หาปริมาณน้ำตาลตามวิธีของ เลน-เอนนอน (Pearson, 1970) จะได้ความเข้มข้นน้ำตาลประมาณ ๑๒-๑๖% เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นประมาณ ๑๐% ละลายแอมโมเนียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเยนฟอสเฟต ลงในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นอย่างละ ๑๐% นำเอาสารละลายน้ำสัปปะรดสารละลายเคมี น้ำกลั่น เข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น ๑๒๑ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที ดึงสารละลายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยปิเปต (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) ให้มีปริมาตรต่าง ๆ ซึ่งเมื่อเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วจะให้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาล ๒% สารเคมีอย่างละ ๐.๕% เตรียมไว้เป็นอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ

๓.๔.๕ ถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ตาม ๓.๔.๓ จำนวน ๒ หลอดลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ (๓.๔.๔) จำนวน ๒๐๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร แบ่งออกใส่ขวดแก้วรูปกรวยขนาด ๕๐๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร มีจุกสำลีพันผ้าปิดอยู่ขวดละ ๕๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตรรวม ๔ ขวด นำเข้าเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ รีซิโปรคอล (reciprocal) อัตราเร็ว ๒๔๐ รอบ/นาที นาน ๑๒ ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเหลวลงไปอีกขวดละ ๕๐ ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ ๔ ด้วยสารละลาย ๑ นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เขย่าต่อไปอีก ๑๒ ชั่วโมง เตรียมถ่ายลงในถังหมักแบบคอลัมน์

๓.๔.๖ เทอาหารเหลวที่เตรียมได้ตาม (๓.๔.๔) ลงในเชื้อหมัก เริ่มแรก (starter) ตาม (๓.๔.๕) ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ ๑ เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโทรนิค ๒๐ ที่ความยาวคลื่น ๕๐๐ นาโนเมตร แบ่งออกมา ๒.๓ ลิตร เตรียมเทใส่ลงในถังหมัก จัดเครื่องหมักโดยปล่อยอากาศปริมาณเล็กน้อยให้ไหลออกจากหัวกระจายอากาศ เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำหมักไหลเข้าไปในท่อส่งอากาศขณะที่เทน้ำหมักลงไป แล้วเทน้ำหมักลงไปจนหมดทั้ง ๒.๓ ลิตร เติมสารละลาย ๑๐% ซิลิโคนลงไปเล็กน้อย แล้วปรับอัตราการไหลของอากาศให้ได้อัตราที่ต้องการ คลายลิ้นในกระเปาะที่ต่อกับท่อป้อนย้อนกลับ (หมายเลข ๙) เพื่อไล่อากาศออก แล้วรีบปิดโดยเร็ว น้ำหมักจะไหลหมุนเวียนผ่านท่อป้อนย้อนกลับ เริ่มนับเวลาการหมัก ทุก ๆ ชั่วโมงไขน้ำหมักออกมาวัดอัตราการเติบโตของยีสต์เซลล์ โดยอ่านค่าสภาพการดูดกลืนแสง (absorbance) หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน การลดลงของ ซี โอ ดี ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป แล้วเติมอาหารเหลวลงไปทดแทน ขณะหมักอาหารถูกใช้ไประดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลง อุณหภูมิสูงขึ้น มีฟองเกิดขึ้น จะต้องควบคุมตัวการเหล่านี้โดยเติมสารละลาย ๑๐% โซเดียมไฮดรอกไซด์ สารละลาย ๑๐% ซิลิโคน ลงไปในช่วงแรกและช่วงหลังของการหมัก การเปลี่ยนแปลงจะมีน้อย จะเติมในปริมาณไม่มากและไม่บ่อยนัก ในช่วงกลางของการหมัก อัตราการเกิดเซลล์มีมาก จะเกิดในปริมาณมากและบ่อยครั้ง

๓.๕ <u>การทดลองเลี้ยงเชื้อในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดไม่ต่อเนื่อง</u>

ดำเนินการเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนในการทดลองตามที่กล่าวมา โดยป้อนอากาศในอัตรา ๐.๕, ๑.๐, ๑.๕ ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที หาอัตราการเติบโตโดยวัดค่าสภาพการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้ง และหาปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป การลดลงของ ซี โอ ดี

๓.๖ <u>การทดลองเลี้ยงเชื้อในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดกึ่งต่อเนื่อง</u>

ดำเนินการเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนในการทดลองโดยป้อนอากาศในอัตรา ๑.๐

ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที จนถึงการหมักชั่วโมงที่ ๕ ถ่ายเทน้ำหมักออกแล้วเติมอาหารเหลวลงไปทดแทนในปริมาตรเดียวกัน หลังจากเติมอาหารเหลวลงไปทดแทนแล้ว รีบดึงน้ำหมักออกมาเพื่อหาค่าต่าง ๆ ดำเนินการทดลองโดย

๓.๖.๑ ถ่ายเทและทดแทนในชั่วโมงที่ ๕, ๗, ๙ ปริมาณ ๑๕% ของ ๒.๓ ลิตร

๓.๖.๒ ทำเช่นเดียวกับ ๒.๖.๑ ในปริมาณ ๒๕%

๓.๖.๓ ทำเช่นเดียวกับ ๓.๖.๑ ในปริมาณ ๓๐%

๓.๖.๔ ทำเช่นเดียวกับ ๓.๖.๑ ในปริมาณ ๔๐%

๓.๖.๕ ถ่ายเทและทดแทนในชั่วโมงที่ ๕, ๖, ๗, ๘ ในปริมาณ ๒๐%

๓.๖.๖ ทำเช่นเดียวกับ ๓.๖.๕ แต่ในปริมาณ ๒๕%

๓.๖.๗ ทำเช่นเดียวกับ ๓.๖.๕ แต่ในปริมาณ ๓๐%

๓.๖.๘ ทำเช่นเดียวกับ ๓.๖.๖ แต่ใช้เครื่องหมักแบบคอลัมน์เครื่องใหญ่ น้ำหมัก ๖ ลิตร

๓.๗ การกำหนดวิธีวิเคราะห์

ในการวัดอัตราการเติบโตของเชื้อหมัก ได้กำหนดวิธีดังนี้

๓.๗.๑ วัดค่าสภาพการดูดกลืนแสง ตามวิธีของ (Vananuvat and Kinsella, 1975) โดยใช้สเปคโทรนิค ๒๐ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ช่วงคลื่น ๕๐๐ นาโนเมตร แสดงค่าในเทอมของสภาพการดูดกลืนแสง ใช้อาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวเทียบ (blank) สำหรับน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของเซลล์มากจะทำให้เจือจางลงโดยน้ำกลั่น ให้อ่านค่าสภาพการดูดกลืนแสงในช่วง ๐.๒ ถึง ๐.๖ ของการวัดค่า

๓.๗.๒ วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหมัก ๒๕ มิลลิลิตร เข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว ๗๔๐ รอบ/นาที เป็นเวลานาน ๓๐ นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำเก็บในขวดตัวอย่างปิดฝาเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อเอาไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และค่าลดลงของ ซี โอ ดี ส่วนที่เป็นเซลล์เติมน้ำกลั่นลงไป ๑๐ มิลลิลิตร กวนให้กระจายนำเข้าเครื่องเหวี่ยง ๓๐ นาที รินเอาน้ำออก ส่วนเซลล์ที่เหลือนำเข้าอบแห้งที่ ๑๐๐ องศา

เซลเซียส ๒ ชั่วโมง หาน้ำหนักคงที่ (Vananuvat and Kinsella, 1975)

๓.๗.๓ วัดปริมาณน้ำตาลในน้ำหมัก (Stiles et al, 1926) เตรียมสารละลาย ๑ นอร์มัล กรดกำมะถัน ๐.๐๐๕ นอร์มัล สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต สารละลายแป้ง ๑% น้ำหนัก/ปริมาตร และ combine micro reagent ดึงตัวอย่างให้มี invert sugar ในช่วง ๓๐-๘๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในขวดจุกเกลียวมาย่อยสลายให้เป็น invert sugar ด้วยกรดเกลือเข้มข้น ๑ มิลลิลิตร ในอ่างน้ำอุณหภูมิ ๗๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน ๑๐ นาที เมื่อเย็นแล้วทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย ๑๐% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปิเปต ๕ มิลลิลิตร microreagent ลงไป ปิดฝาเกลียวต้มในอ่างน้ำเดือดนาน ๑๕ นาที เมื่อเย็นแล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้น ๑ นอร์มัลลงไป ๕ มิลลิลิตร เขย่านาน ๑ นาที แล้วไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน ๐.๐๐๕ นอร์มัล ไทโอซัลเฟต จนได้สีเหลืองอ่อน จึงเติมสารละลายน้ำแป้ง ๑% ลงไป ๒ มิลลิลิตร ไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินหายไป ทำในตัวเทียบ (blank) เช่นเดียวกันโดยใช้ ๕ มิลลิลิตรน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ค่าแตกต่างระหว่างตัวเทียบ และที่อ่านได้จากตัวอย่าง จะหาปริมาณน้ำตาลได้

๓.๗.๔ หาปริมาณของ ซี โอ ดี (Porges et al, 1950) เตรียมสารละลายไดโครเมต โปตัสเซี่ยมไอโอไดน์ สารละลายน้ำแป้ง และสารละลายมาตรฐาน ๐.๐๕ นอร์มัล โซเดียมไทโอซัลเฟต ปิเปตสารละลายไดโครเมท จำนวน ๕๐ มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร ปิเปตน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้วใส่ตามลงไป เขย่าแล้วนำไปตั้งบนเตาไฟฟ้าที่ควบคุมปริมาณความร้อนซึ่งจะทำให้สารละลายมีอุณหภูมิถึง ๑๖๕-๑๗๕ องศาเซลเซียส ภายในเวลาประมาณ ๕ ถึง ๖ นาที กวนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลา เมื่ออุณหภูมิถึงแล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำลงไปประมาณ ๒๕๐ มิลลิลิตร แช่น้ำเย็นแล้วเติมสารละลายโปตัสเซียมไอโอไดน์ นำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน ๐.๐๕ นอร์มัล ไทโอซัลเฟต จนสีเหลืองอ่อน เติมสารละลายน้ำแป้งลงไป ๒ มิลลิลิตร ไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินหายไป ทำตัวเทียบ แล้วหาความแตกต่างของปริมาณไทโอซัลเฟตที่ใช้กับตัวเทียบ และใช้กับตัวอย่างน้ำหมัก คำนวณค่า ซี โอ ดี ในหน่วย

ของ มิลลิกรัม/ลิตร หรือส่วนในล้านได้โดยสูตร COD = 8OD เมื่อ D คือความแตกต่างของการใช้ ๐.๐๕ นอร์มัล ไทโอซัลเฟต ระหว่างตัวเทียบและตัวอย่าง คำนวณการลดลงของ ซี โอ ดี โดยใช้ค่าที่เวลา ๐ เป็นตัวตั้งต้น

๓.๗.๕ หาปริมาณโปรตีน โปรตีนคำนวณได้จากจำนวนไนโตรเยน × 6.25 (Worgan,1973) และไนโตรเยนหาได้ตามวิธีของ A.O.A.C. 1975 โดยดัดแปลงปริมาณและการใช้ตัวเร่งคือ ยีสต์แห้งที่คำนวณหาน้ำหนักแล้วนำมาละลายน้ำเทลงในขวดเคดาห์ลขนาดประมาณ ๕๐๐ ซีซี จนหมดแล้วใส่กรดกำมะถันเข้มข้นลงไป ๒๐ มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเปลวไฟจากตะเกียงแกสย่อยสลายจนใส แล้วนับเวลาต่อไปอีกประมาณ ๑ ชั่วโมง นำมาล้างใส่ขวดกลั่นขนาด ๑ ลิตร เติม ๔๐% สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ๔๐ มิลลิลิตร กลั่นไล่แอมโมเนียลงในสารละลาย ๔% กรดบอริกประมาณ ๒๕ ซีซี แล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถันเข้มข้น ๐.๑ นอร์มัล มีเมธิลเรด เมธิลีนบลู เป็นอินดิเกเตอร์ ไตเตรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง ทำเทียบกับตัวเทียบแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเยน