# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## วัสดุ

### 1. จุลินทรีย์

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตคีเฟอรัน *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 เก็บหัวเชื้อเริ่มต้นในกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 50 และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

**2.1 อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น**

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS สำหรับเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 ประกอบด้วย ทริปโตนร้อยละ 2, ยีสต์สกัดร้อยละ 1, เนื้อสกัดร้อยละ 2, กลูโคสร้อยละ2, $K_2HPO_4$ ร้อยละ 0.2, Triammonium citrate ร้อยละ0.4, Sodium acetate ร้อยละ 0.5, ทวีน 80ร้อยละ 0.1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ร้อยละ 0.028, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ร้อยละ 0.058, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ร้อยละ 0.074 (พีเอช 5.5)

**2.2 อาหารสูตร MRS-sago Starch** (สำหรับผลิตคีเฟอรัน)

ประกอบด้วย อาหารสูตร MRS medium ที่เติมแป้งสาคู ลงไปแทนกลูโคส

### 3. เอนไซม์

3.1 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากสายพันธุ์ *Bacillus* (52.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โดยที่ 1 ยูนิต หมายถึงความสามารถในการย่อยแป้งได้มอลโตส 1 มิลลิกรัม ภายในเวลา 3 นาทีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ) ซื้อจากบริษัท Sigma โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

3.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากราสายพันธุ์ *Rhizopus* (21,000ยูนิตต่อกรัมของแข็ง โดยที่ 1 ยูนิต หมายถึงความสามารถในการย่อยแป้งได้กลูโคส 1 มิลลิกรัมภายในเวลา 3 นาที ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) ซื้อจากบริษัท Sigma โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ทำการกรองสารละลายเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 45 เพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อน

### 4. แป้งสาคู

แป้งสาคูจากสหกรณ์การเกษตร หมู่ 5 ตำบลช่อง อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง

**5. สารเคมี**

5.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก)

5.1.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

5.1.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน (สารละลายแอนโทรนรีเอเจนต์)

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดสำหรับการวิเคราะห์

**อุปกรณ์**

**1. อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์**

- ขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร
- ถังหมักขนาด 2 ลิตร
- จานให้ความร้อน (hot plate) รุ่น HS 115 บริษัท Ika Labotechnic
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น RO 5 บริษัท Ika Labotechnic
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- ตู้อบ (Universal oven) รุ่น UM 200-800 บริษัท Memmert
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

**2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์**

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
- เครื่องวัดพีเอช รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc.
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5403 บริษัท Eppendrof
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- ตู้เก็บอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**วิธีวิเคราะห์**

**1. ค่าพีเอช**

วัดค่าพีเอชของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

**2. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น**

เตรียมหัวเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (พีเอช 5.5) ในหลอดฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

**3. การวัดการเจริญของเชื้อ**

วัดการเจริญของเชื้อ โดยใช้การวัดค่าความขุ่น หรือการดูดกลืนแสง โดยทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 660 นาโนเมตร ($OD_{660}$)

**4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi**

นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นน้ำตาลอยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ 1มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส (ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 0, 50, 100, 150, และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

**5. การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน**

นำสารละลายส่วนใสและส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน (Cheirsilp *et al*., 2001) โดยนำสารละลายส่วนใสมาผ่านขั้นตอนการกำจัดแป้งที่ปนเปื้อนก่อน

5.1 การกำจัดแป้งที่จะปนเปื้อนในการวัดปริมาณคีเฟอรัน

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ 1 มิลลิลิตรมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเข้มข้น 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจนไม่เหลือแป้งโมเลกุลใหญ่ที่จะตกตะกอนมาพร้อมคีเฟอรันในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอล จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนและวิเคราะห์หาปริมาณคีเฟอรันต่อไป

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในสารละลายส่วนใส (Broth kefiran)

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.1 มาตกตะกอนด้วย เอทานอล (-20 องศาเซลเซียส) ในปริมาตรที่เท่ากัน (1:1) จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนที่แยกได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยเอทานอลซ้ำอีกครั้ง ในปริมาตรที่เท่ากัน เก็บตะกอนที่ได้จากการเหวี่ยงแยกไปละลายน้ำ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีแอนโทรน (Anthrone method) โดยปิเปตสารละลายส่วนใสที่ได้ 0.25 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายแอนโทรนรีเอเจนต์ 2.5 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ Broth kefiran ที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตส (Cheirsilp *et al*., 2001)

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในตะกอนเซลล์ (Capsular kefiran)

ตะกอนที่ได้จากการเหวี่ยงแยกสารละลายส่วนใส จะถูกนำไปต้มด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารผสมที่ได้ไปเหวี่ยงแยกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเอทานอล และวิเคราะห์หาปริมาณ Capsular kefiran ด้วยวิธีการเดียวกับ Broth kefiran

โดยปริมาณคีเฟอรันที่ศึกษาคือ ปริมาณคีเฟอรันรวม (Total kefiran) ของ Broth kefiran และ Capsular kefiran

**6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ**

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design , CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 2 หรือ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’ s new multiple - range test (DMRT)

**วิธีการทดลอง**

**1. ศึกษาการใช้แป้งสาคูเป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรัน โดยเชื้อ *L. kefiranofaciens***

1.1 ศึกษาผลของการให้ความร้อนแก่แป้งสาคู

เตรียมอาหารสูตร MRS-sago starch ที่เติมแป้งสาคูร้อยละ 2 แทนกลูโคส พีเอช 5.5 ในขวดดูแรนมีฝาปิด (Duran) ขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด โดยขวดที่ 1 ทำให้แป้งสุกโดยนำสารละลายแป้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมลงไป สำหรับขวดที่ 2 ใช้แป้งดิบที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการผสมสารละลายแป้งสาคูและอาหารในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในอัตราส่วน 1:1 โดยความเข้มข้นเอนไซม์ผสมเท่ากับ 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ลงไปในขวดทั้งสอง เติมหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ3.0 ปริมาตรร้อยละ 5 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกชนิดของแป้งสาคูที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

เลือกผลการทดลองที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุดจากข้อ 1.1 นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหารสูตร MRS-sago starch ในขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0 ใช้วิธีการทดลองตามข้อ1.1 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกค่าพีเอชเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกผลการทดลองที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุดจากข้อ 1.1 นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหารสูตร MRS-sago starch ในขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับผลจากข้อ 1.2 ใช้วิธีการทดลองเดียวกัน นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28, 30, 32 และ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช

และปริมาณ คีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกอุณหภูมิเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.4 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งสาคูที่ใช้เป็นสารตั้งต้น

เตรียมอาหารสูตร MRS-sago starch โดยใช้ชนิดของแป้งที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุดจากข้อ 1.1 ที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้นที่ร้อยละ 2, 3, 4 และ 5 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ที่พีเอชเริ่มต้นจากข้อ 1.2 และอุณหภูมิจากข้อ 1.3 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.5 ศึกษาอัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคู

เตรียมอาหารสูตร MRS-sago starch ในขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด ปรับพีเอชเริ่มต้นจากข้อ 1.2 เติมเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปริมาตร 1มิลลิลิตร ในอัตราส่วน1:1 โดยให้กิจกรรมรวมของเอนไซม์ผสมเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200ยูนิตต่อกรัมแป้ง เติมหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* และทำการทดลองที่อุณหภูมิจากข้อ 1.3 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกอัตราส่วนกิจกรรมรวมของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.6 ศึกษาอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมอาหารสูตร MRS-sago starch ในขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตรโดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด จากข้อ 1.1 เติมเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในอัตราส่วนที่ต่างกัน

โดยในชุดทดลองที่ 1 เติมเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 100:0

ชุดทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 80:20

ชุดทดลองที่ 3 เติมเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 60:40

ชุดทดลองที่ 4 เติมเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 50:50

ชุดทดลองที่ 5 เติมเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 40:60

เติมหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* และทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 1.5 โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 1.5 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96

และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**2. ศึกษาผลของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม**

เลือกสภาวะการทดลองที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุดจากข้อ 1 นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหารสูตร MRS-sago starch ในขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2, 5, 7 และ10 ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3. การขยายขนาดการทดลอง**

เลือกสภาวะการทดลองที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุดจากข้อ 1และข้อ 2 นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหารสูตร MRS-Sago starch ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 โดยชุดการทดลองที่ 1 ไม่ควบคุมพีเอชและชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอลให้เท่ากับ 5.5 ตลอดการทดลอง

เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์การเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เปรียบเทียบชุดการทดลองที่ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด