ภาคผนวก ก

1 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 Urea agar slant

Urea agar base	21	กรัมต่อลิตร

ต้มให้ละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 ด้วย สาระลายกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ แบ่งใส่หลอดๆละ 4.5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอดผสมให้เข้ากัน ปล่อยแข็งในสภาพเอียง

1.2 Fewell's acetate agar

ละลาย sodium acetate trihydrate 5.0 กรัมในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5-7.0 เติมผงวุ้น 20.0 กรัม ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ3.5มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยแข็งในสภาพเอียง

1.3 Gorodkowa agar ประกอบด้วย

Glucose	1.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	5.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	20.0	กรัมต่อลิตร

ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ3.5มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยแข็งในสภาพเอียง

1.4 5% Malt extract agar ประกอบด้วย

Malt extract	50.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	20.0	กรัมต่อลิตร

ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ3.5มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยแข็งในสภาพเอียง

1.5 Mc Clary'acetate agar ประกอบด้วย

Glucose	1.0	กรัมต่อลิตร
KCl	1.8	กรัมต่อลิตร
sodium acetate trihydrate	8.2	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2.5	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15.0	กรัมต่อลิตร

ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ3.5มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยแข็งในสภาพเอียง

1.6 Sabouraud's 4% glucose 0.5% yeast extract agar ประกอบด้วย

Peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	40.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 แล้วเติมผงวุ้น 20.0 กรัม ต้มให้ผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.7 Yeast extract-Malt extract (YM) agar ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	20.0	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.8 Yeast extract-Malt extract (YM) broth ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.9 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) agar ประกอบด้วย

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	20.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	20.0	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.10 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) broth ประกอบด้วย

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	20.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.11 Fermentation of glucose ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
Bromothymol blue sol	40	มิลลิลิตร

ต้มให้ละลาย ดูดใส่หลอดที่มีหลอด Durham's tubeหลอดๆละ 7 มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.12 Fermentation of other sugar ประกอบด้วย

Yeast extract	4.5	กรัมต่อลิตร
Peptone	7.5	กรัมต่อลิตร

ต้มให้ละลาย เติม stock bromothymol blue sol. 4 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตร ของ fermentation medium จากนั้นเตรียมน้ำตาลที่จะนำมา ทดสอบให้มีความเข้มข้น 2 % (W/V) นำทั้งสองส่วนมารวมกันอัตราส่วน 2 : 1 (น้ำตาลที่ใช้ทดสอบ : fermentation medium) ดูดใส่หลอดที่มีหลอด Durham's tubeหลอดๆละ 7 มิลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.13 Yeast carbon base (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)

Yeast carbon base	11.7	กรัมต่อลิตร

ต้มให้ละลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจากนั้นตั้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียสทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ดูดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.14 Yeast carbon base (มีแหล่งไนโตรเจน) ประกอบด้วย

Yeast carbon base	11.7	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulfate	0.5	กรัมต่อลิตร
หรือ Potassium nitrate	0.78	กรัมต่อลิตร
หรือ Sodium nitrate	0.26	กรัมต่อลิตร

ต้มให้ละลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจากนั้นตั้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียสทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ดูดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.15 Bromothymol blue solution

ละลาย bromothymol blue 50 มิลลิกรัม ในน้ำ 75.0 มิลลิลิตร

1.16 DBB reagent

ละลายไดอะโซเนียม บลู บี ซอลท์(diazonium Blue B salt)ใน 0.1 M tris (hydroxymethyl) inomethane (tris)buffer พีเอช 7.0 ที่ทำให้เย็น สาร diazonium Blue B salt ไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสภาพร้อนและชื้น จึงควรเก็บไว้ในสภาพแห้ง ที่ 4 องศาเซลเซียส และส่วนที่เตรียมเป็นสารละลายแล้วควรเก็บในที่เย็นและใช้ภายในเวลา 30 นาที หลังจากเตรียมเสร็จและก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

ภาคผนวก ข

1 วิธีการวิเคราะห์หาความชื้นของสารสกัดพืชสมุนไพร (A.O.A.C, 1990)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบร้อน
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

1.2 วิธีวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
2. กระทำเช่นข้อที่1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบร้อนใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาทีและกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาความชื้นจากสูตร

ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

$$= 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

AGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGA

TTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTG

GGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATT

CCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAA

AGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTC

TCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCT

TCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGNACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCA

NAACGNCGCAACACCGCCCGTCTGNAAAAACGNACCAA

ภาพที่ 5 ลำดับเบสดีเอนเอ ของยีสต์ *Issatchenkia orientalis*

Fig 5 DNA sequencing of *Issatchenkia orientalis*

CANCGGGATGCCTCNCAACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGGCGACTTTGGGGCGG
CTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCCGTGTAAAGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGA
AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCCCGCTCCTCGTGGGCGGGGGACTCTCGCAGCT
CACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCCGGACAAAACTGCAGGAACGTAGCTTGCTTCGGGAAGTGTTACAGCCTGCAGGAATACGGCCAGCCGGGACTGAGG
AATGCGATTCGNCAAGGATGCTGGCATAATGNTTATATGCCGCCCGTCTGAAAAACCCGGACNAA

ภาพที่ 6 ลำดับเบสดีเอนเอ ของยีสต์ *Candida humilis*

Fig 6 DNA sequencing of *Candida humilis*

GGGATTGCCTTAGTAGCGGCGGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGG
CTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGA
AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCG
GGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGC
GGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTGNAAAACACGGNACCAA

ภาพที่ 7 ลำดับเบสดีเอนเอ ของยีสต์ *Candida parapsilosis*

Fig 7 DNA sequencing of *Candida parapsilosis*

CGGGATTGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGCAACTTTGGTGCTGGTC
CTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTGCTATGTAAAGTGCTTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGA
ATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAA
GAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGACCCTCGCTCCTTGTGGGTGGGGATCTCGCAGCTCACTG
GGCCAACATCGGTTTTGGCGGCAGGATAAAACTTTGGGAATGTAGCTTGTCTTCGGAGAAGTATTATAGCCCAAGGCAATACTGCCAGCCGGGACCGAGGACTG
CGACTTTGTCAAGGATGTTGGCATAATGNTTATATGCCGCCCGTCTGAAAAACCCCGGACCAA

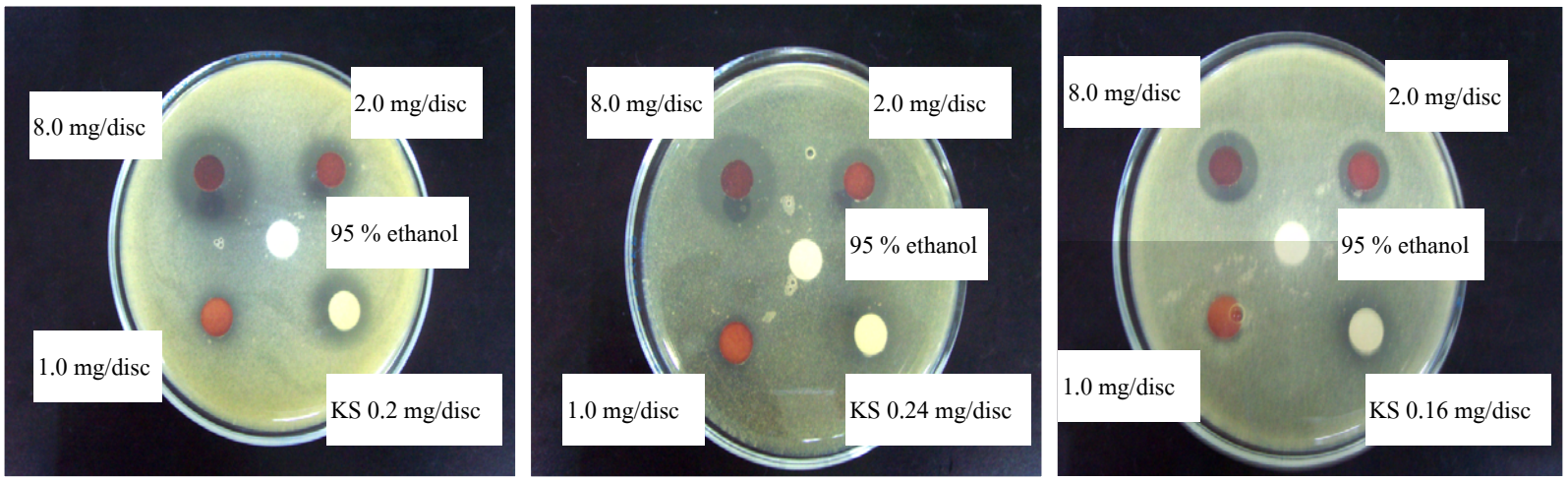
ภาพที่ 8 ลำดับเบสดีเอนเอ ของยีสต์ *Zygosaccharomyces fermentati*

Fig 8 DNA sequencing of *Zygosaccharomyces fermentati*

CGGGATTGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTCGACGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGG
TCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTATTTGTAAAGTGCTTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAA
AAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGCGTTTGCTTCGGCTTTCGCTGGGCCAGCATCAGTTTTAGCGGTTGG
ATAAATCCTCGGGAATGTGGCTCTGCTTCGGTAGAGTGTTATAGCCCGTGGNAATACAGCCAGCTGGGACTGAGGATTGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCGTA
ATGNTTAATGCCGCCCGTCTGAAAACACGGACCA

ภาพที่ 9 ลำดับเบสดีเอนเอ ของยีสต์ *Kluyveromyces marxianus*

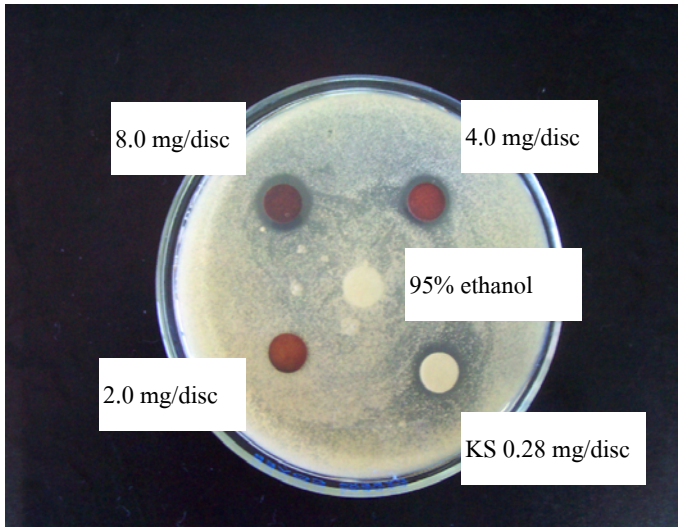
Fig 9 DNA sequencing of *Kluyveromyces marxianus*



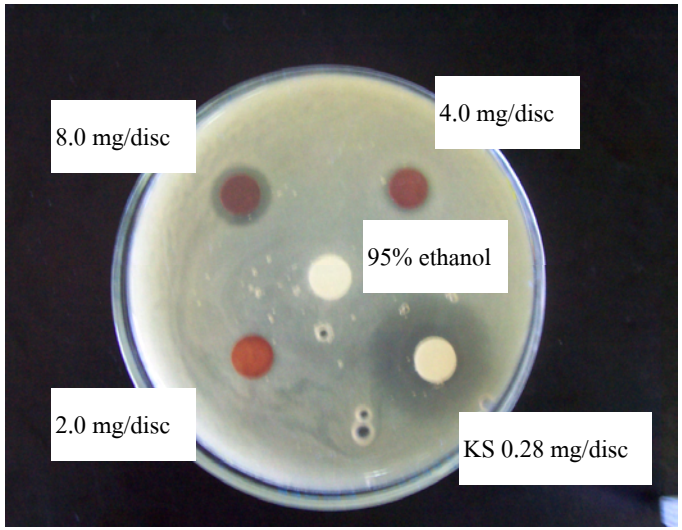
C. parapsilosis *Z. fermentati* *K. marxianus*

ภาพที่ 10 การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

Fig 10 Antiyeasts activity of cinnamon extract was screened by disc diffusion technique at the differences concentration.



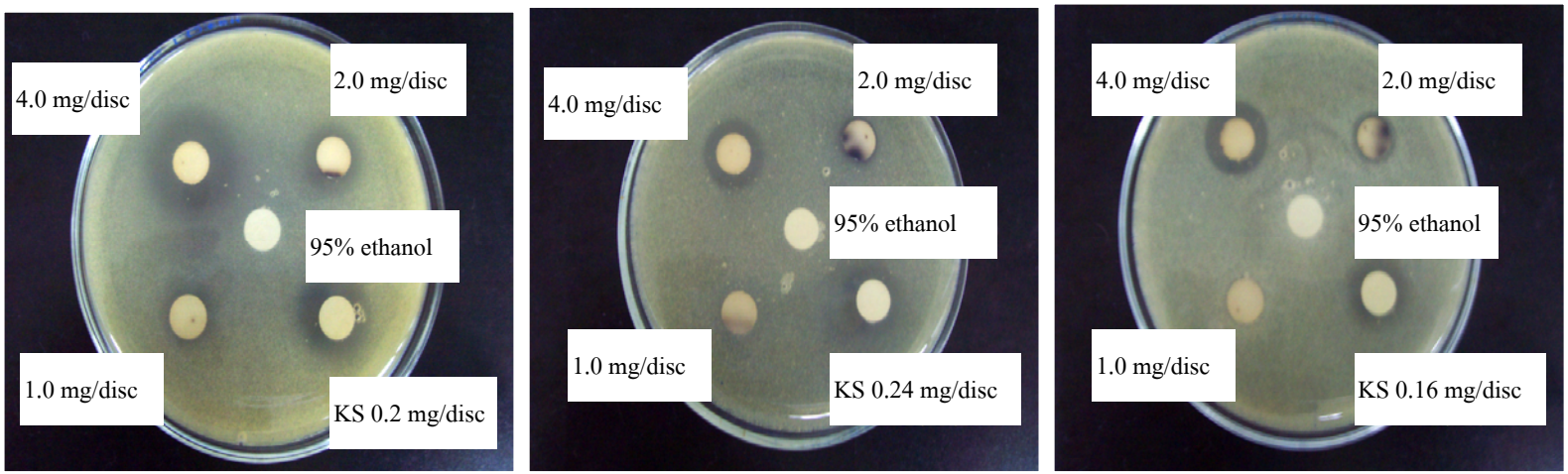
I. orientalis



C. humilis

ภาพที่ 11 การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

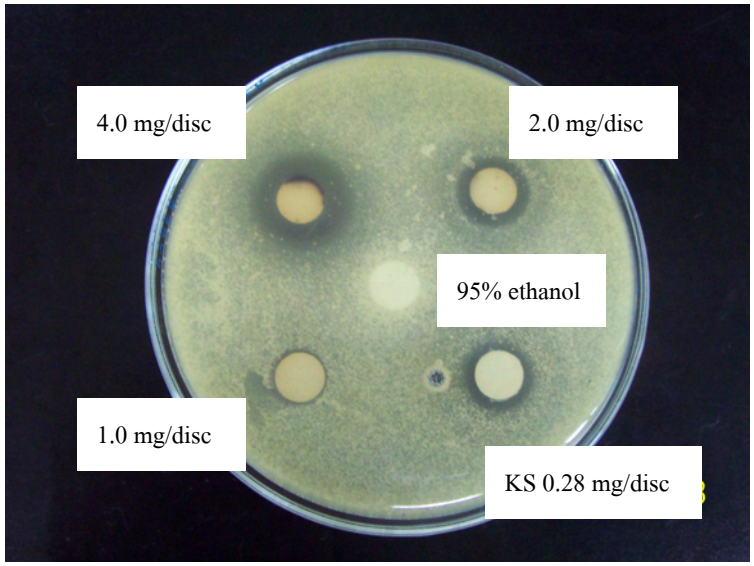
Fig 11 Antiyeasts activity of cinnamon extract was screened by disc diffusion technique at the differences concentration.



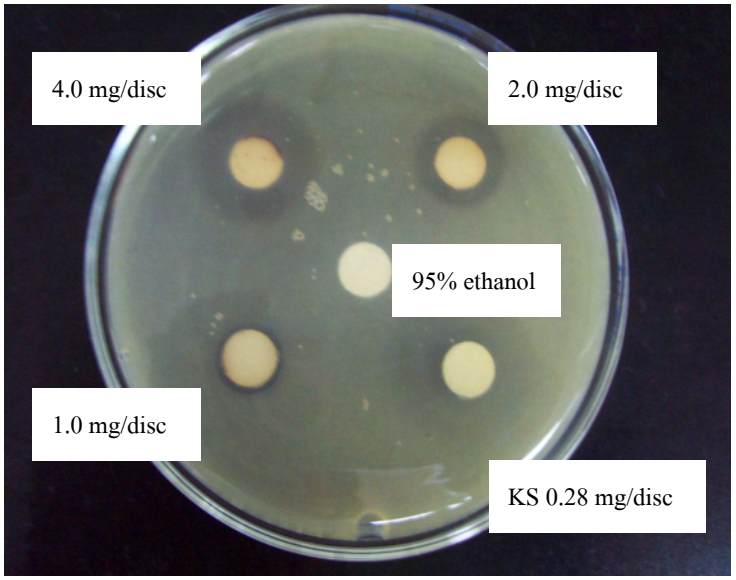
C. *parapsilosis* Z. *fermentati* *K. marxianus*

ภาพที่ 12 การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

Fig 12 Antiyeasts activity of clove extract was screened by disc diffusion technique at the differences concentration.



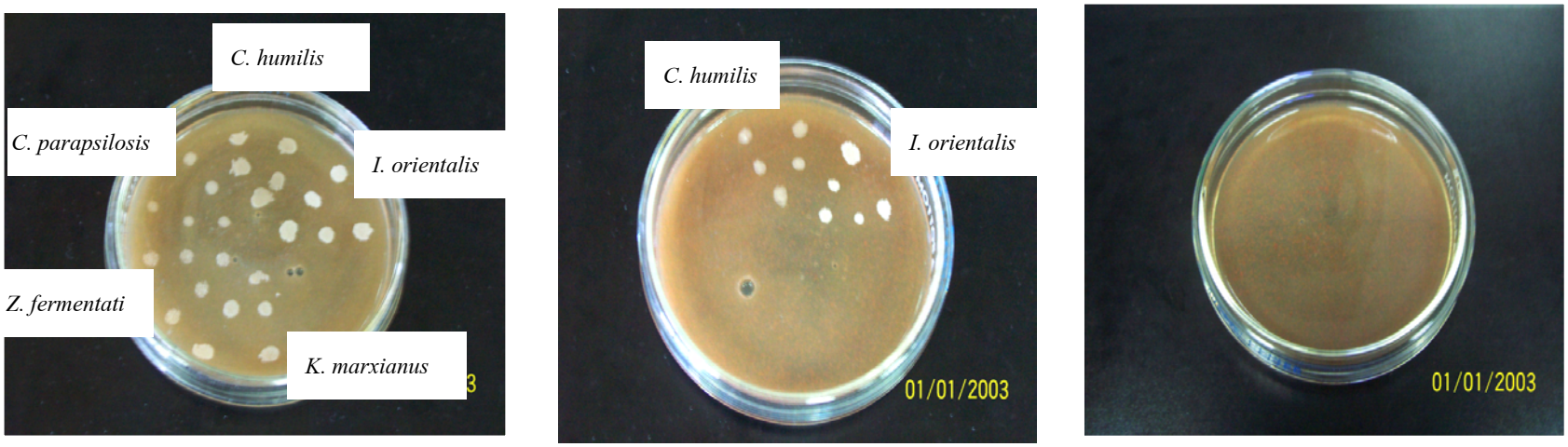
I. orientalis



C. humilis

ภาพที่ 13 การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

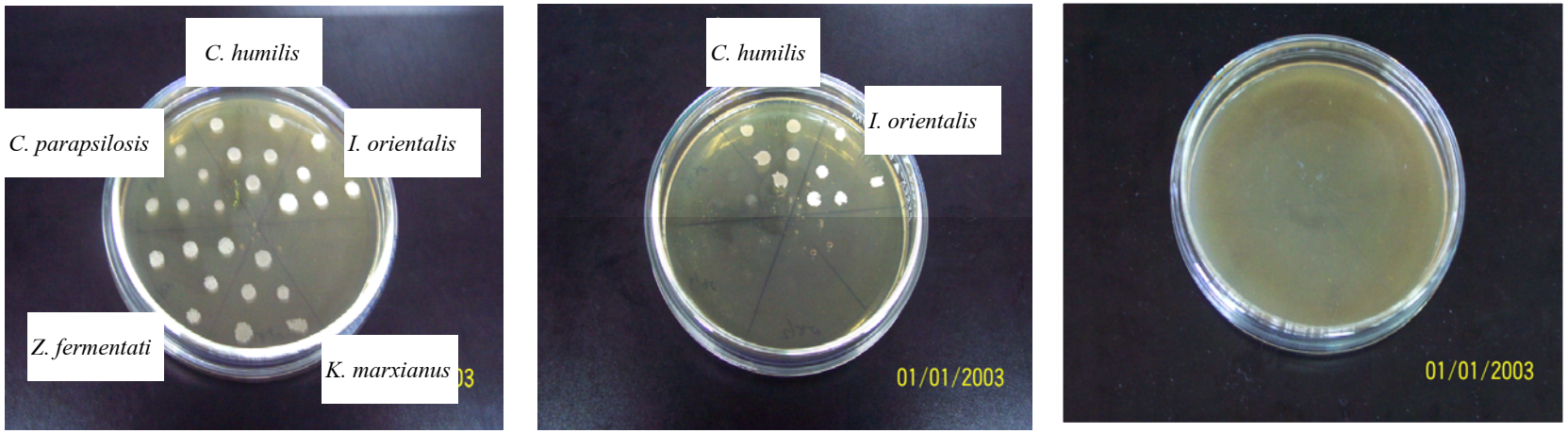
Fig 13 Antiyeasts activity of clove extract was screened by disc diffusion technique at the differences concentration.



0.5 mg/ml 1.0 mg/ml 2.0 mg/ml

ภาพที่ 14 ค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดอบเชย โดยวิธี agar dilution

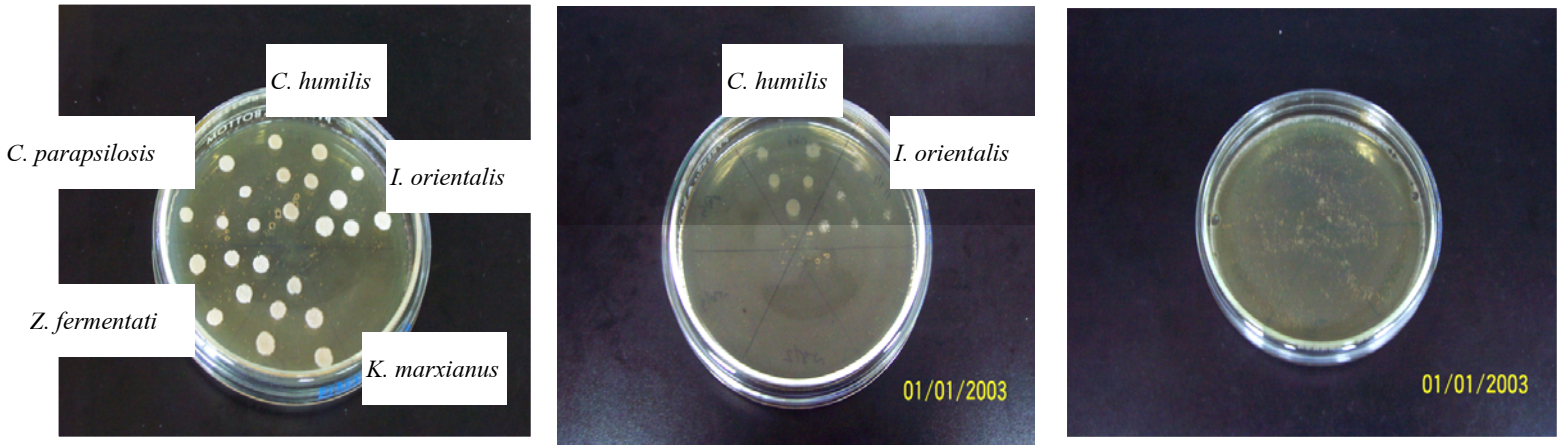
Fig 14 Minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamon extract was determined by the agar dilution method.



0.25 mg/ml 0.5 mg/ml 1.0 mg/ml

ภาพที่ 15 ค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดกานพลู โดยวิธี agar dilution

Fig 15 Minimum inhibitory concentration (MIC) of clove extract was determined by the agar dilution method.



0.2 mg/ml 0.4 mg/ml 0.8 mg/ml

ภาพที่ 16 ค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท โดยวิธี agar dilution

Fig 16 Minimum inhibotory concentration (MIC) of potassium sorbate was determined by agar dilution method.

ตารางที่ 17 ข้อมูลการตอบสนองของยีสต์ต่อปัจจัย 3 ปัจจัยๆละ 3 ระดับ

Table 17 Experimental data for the three-factor, three level response surface analysis [a]

Independent variables				Dependent variables		
Treatment	Sucrose (^{0}Brix)	pH	Cinnamon (mg/ml)	*C. parapsilosis*	*Z. fermentati*	*K. marxia*nus
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	1(20)	1(4.0)	0(1.0)	6.05	4.36	5.93
2	1(20)	-1(2.0)	0(1.0)	5.34	3.49	0.00
3	-1(10)	1(4.0)	0(1.0)	6.64	4.07	5.67
4	-1(10)	-1(2.0)	0(1.0)	5.38	3.65	0.00
5	1(20)	0(3.0)	1(1.5)	6.11	0.00	0.00
6	1(20)	0(3.0)	-1(0.5)	6.77	6.79	7.57
7	-1(10)	0(3.0)	1(1.5)	6.27	0.00	0.00
8	-1(10)	0(3.0)	-1(0.5)	6.81	6.74	7.77
9	0(15)	1(4.0)	1(1.5)	6.32	0.00	0.00
10	0(15)	1(4.0)	-1(0.5)	6.84	6.90	7.62
11	(15)	-1(2.0)	1(1.5)	4.23	0.00	0.00
12	0(15)	1(2.0)	-1(0.5)	5.39	4.57	3.69
13	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	6.27	4.14	4.27
14	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	6.34	4.17	4.25
15	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	6.20	4.23	4.20

[a] The experimental runs were performed in a random order

ตารางที่18 ข้อมูลการตอบสนองของยีสต์ต่อปัจจัย 3 ปัจจัยๆละ 3 ระดับ

Table 18 Experimental data for the three-factor, three level response surface analysis [a]

Independent variables				Dependent variables		
Treatment	Sucrose(^{0}Brix)	pH	Clove (mg/ml)	*C. parapsilosis*	*Z. fermentati*	*K. marxia*nus
	X_1	X_2	X_3	Y_4	Y_5	Y_6
1	1(20)	1(4.0)	0(1.0)	4.17	3.30	3.62
2	1(20)	-1(2.0)	0(1.0)	0.00	0.00	0.00
3	-1(10)	1(4.0)	0(1.0)	0.00	0.00	0.00
4	-1(10)	-1(2.0)	0(1.0)	0.00	0.00	0.00
5	1(20)	0(3.0)	1(1.5)	0.00	0.00	0.00
6	1(20)	0(3.0)	-1(0.5)	5.75	5.65	5.88
7	-1(10)	0(3.0)	1(1.5)	0.00	0.00	0.00
8	-1(10)	0(3.0)	-1(0.5)	5.57	3.49	4.11
9	0(15)	1(4.0)	1(1.5)	0.00	0.00	0.00
10	0(15)	1(4.0)	-1(0.5)	5.54	5.75	6.00
11	0(15)	-1(2.0)	1(1.5)	0.00	0.00	0.00
12	0(15)	-1(2.0)	-1(0.5)	4.30	0.00	0.00
13	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	4.53	3.30	2.77
14	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	3.77	3.49	2.63
15	0(15)	0(3.0)	0(1.0)	3.71	3.25	2.65

[a] The experimental runs were performed in a random order

ตารางที่ 19 ข้อมูลการตอบสนองของยีสต์ต่อปัจจัย 3 ปัจจัยๆละ 3 ระดับ

Table 19 Experimental data for the three-factor, three level response surface analysis [a]

Independent variables				Dependent variables		
Treatment	Sucrose(^{0}Brix)	pH	Potassium sorbate (mg/ml)	*C. parapsilosis*	*Z. fermentati*	*K. marxianus*
	X_1	X_2	X_3	Y_7	Y_8	Y_9
1	1(20)	1(4.0)	0(2.0) ,(1.2)	5.84	4.82	3.62
2	1(20)	-1(2.0)	0(2.0) ,(1.2)	0.00	0.00	0.00
3	-1(10)	1(4.0)	0(2.0),(1.2)	5.59	5.55	5.25
4	-1(10)	-1(2.0)	0(2.0) ,(1.2)	0.00	0.00	0.00
5	1(20)	0(3.0)	1(3.6),(2.0)	0.00	0.00	0.00
6	1(20)	0(3.0)	-1(0.4),(0.4)	5.86	5.79	5.67
7	-1(10)	0(3.0)	1(3.6),(2.0)	0.00	1.93	0.00
8	-1(10)	0(3.0)	-1(0.4),(0.4)	5.71	5.94	5.83
9	0(15)	1(4.0)	1(3.6),(2.0)	5.98	1.99	0.00
10	0(15)	1(4.0)	-1(0.4),(0.4)	5.80	5.87	5.54
11	0(15)	-1(2.0)	1(3.6) ,(2.0)	0.00	0.00	0.00
12	0(15)	-1(2.0)	-1(0.4) , (0.4)	5.49	5.17	5.04
13	0(15)	0(3.0)	0(2.0) , (1.2)	4.82	2.15	0.00
14	0(15)	0(3.0)	0(2.0) , (1.2)	4.78	2.11	0.00
15	0(15)	0(3.0)	0(2.0) , (1.2)	4.87	2.12	0.00

[a] The experimental runs were performed in a random order

potassium sorbate concentration(0.4, 2.0, 3.6 mg/ml) for *C. parapsilosis* and (0.4, 1.2, 2.0 mg/ml) for *Z. fermentati* and *K. marxianus*

ตารางที่ 20 ข้อมูลการตอบสนองของยีสต์ต่อปัจจัย 3 ปัจจัยๆละ 3 ระดับ

Table 20 Experimental data for the three-factor, three level response surface analysis [a]

Independent variables						Dependent variables		
Treatment	NaCl(^{0}Brix)	pH	cinnamon	clove	Potassium sorbate (mg/ml)	*I. orientalis*		
	X_1	X_2		X_3		Y_{10}cinnamon	Y_{11} clove	Y_{12} potassium
1	1(42)	1(4.0)	0(2.0)	0.6	1.6	4.55	3.54	4.25
2	1(42)	-1(3.0)	0(2.0)	0.6	1.6	2.44	0.00	0.00
3	-1(32)	1(4.0)	0(2.0)	0.6	1.6	4.63	4.36	4.56
4	-1(32)	-1(3.0)	0(2.0)	0.6	1.6	2.50	0.00	0.00
5	1(42)	0(3.5)	1(3.0)	1.0	2.4	1.53	0.00	0.00
6	1(42)	0(3.5)	-1(1.0)	0.2	0.8	6.46	5.76	4.53
7	-1(32)	0(3.5)	1(3.0)	1.0	2.4	1.36	0.00	0.00
8	-1(32)	0(3.5)	-1(1.0)	0.2	0.8	6.60	6.00	4.80
9	0(37)	1(4.0)	1(3.0)	1.0	2.4	2.55	0.00	0.00
10	0(37)	1(4.0)	-1(1.0)	0.2	0.8	6.51	6.20	5.43
11	0(37)	-1(3.0)	1(3.0)	1.0	2.4	0.00	0.00	0.00
12	0(37)	-1(3.0)	-1(1.0)	0.2	0.8	5.66	5.66	4.07
13	0(37)	0(3.5)	0(2.0)	0.6	1.6	4.04	0.00	0.00
14	0(37)	0(3.5)	0(2.0)	0.6	1.6	4.17	0.00	0.00
15	0(37)	0(3.5)	0(2.0)	0.6	1.6	4.20	0.00	0.00

[a] The experimental runs were performed in a random order

ตารางที่ 21 สัมประสิทธิ์ความถดถอยของการตอบสนองของยีสต์

Table 21 Regression coefficient and analysis of variance of the second order polynomial for response variables

Coefficient	*C. parapsilosis* Y1 k = 1	*Z. fermentati* Y2 k=2	*K. marxianus* Y 3 k=3
β_{ko}	2.58	0.22	-13.00
β_{k1}	-0.27	-0.19	0.14
β_{k2}	3.81	3.68	10.76
β_{k3}	-1.30	4.59	0.84
β_{k11}	0.009	0.004	-0.006
β_{k22}	-0.55	-0.40	-1.17
β_{k33}	-0.09	-3.64	-0.95
β_{k12}	-0.005	0.02	0.01
β_{k13}	0.01	0.004	0.01
β_{k23}	0.32	-1.16	-1.96

ตารางที่ 22 สัมประสิทธ์ความถดถอยของการตอบสนองของยีสต์

Table 22 Regression coefficient and analysis of variance of the second order polynomial for response variables.

Coefficient	*C. parapsilosis* Y4 k = 4	*Z. fermentati* Y5 k= 5	*K. marxianus* Y 6 K= 6
β_{ko}	-9.95	-26.43	-17.65
β_{k1}	0.85	0.86	0.23
β_{k2}	7.18	11.64	9.82
β_{k3}	-5.45	9.94	6.02
β_{k11}	-0.04	-0.03	-0.01
β_{k22}	-1.50	-1.68	-1.39
β_{k33}	1.14	-0.89	0.81
β_{k12}	0.20	0.16	0.18
β_{k13}	-0.01	-0.21	-0.17
β_{k23}	-0.62	-2.87	3.00

ตารางที่ 23 สัมประสิทธ์ความถดถอยของการตอบสนองของยีสต์

Table 23 Regression coefficient and analysis of variance of the second order polynomial for response variables.

Coefficient	*C. parapsilosis* Y = 7 k = 7	*Z. fermentati* Y = 8 k= 8	*K. marxianus* Y = 9 k = 9
β_{ko}	-11.68	6.03	20.94
β_{k1}	2.01	-0.20	-1.28
β_{k2}	1.88	0.77	-3.37
β_{k3}	-3.54	-6.14	-9.33
β_{k11}	-0.06	0.01	0.04
β_{k22}	-0.27	0.15	0.99
β_{k33}	-0.09	1.52	2.58
β_{k12}	0.01	-0.03	-0.08
β_{k13}	-0.004	-0.11	0.01
β_{k23}	0.88	0.40	-0.15

ตารางที่ 24 สัมประสิทธ์ความถดถอยของการตอบสนองของยีสต์

Table 24 Regression coefficient and analysis of variance of the second order polynomial for response variables.

Coefficient	*I. orientalis* Y10 k=10	*I. orientalis* Y11 k= 11	*I. orientalis* Y = 12 k = 12
β_{ko}	-21.17	93.54	107.91
β_{k1}	0.41	-2.64	-3.13
β_{k2}	13.02	-22.48	-26.43
β_{k3}	-6.01	-20.85	-6.88
β_{k11}	-0.006	0.03	0.04
β_{k22}	-1.82	4.00	4.49
β_{k33}	-0.001	12.28	1.95
β_{k12}	-0.001	-0.08	-0.03
β_{k13}	0.01	0.02	0.01
β_{k23}	0.85	0.67	-0.84

ตารางที่ 25 ค่าความแปรปรวนของปัจจัยต่างๆต่อการสนองของยีสต์

Table 25 ANOVA : overall effect of independent variables on response variable.

Independent variable	df	Sum of squares			
		C. parapsilosis	*Z. fermentati*	*K. maxianus*	*I. orientalis*
Sucrose or NaCl concentration	4	0.24	0.10	0.13	0.10
pH	4	5.67**	3.63*	39.12*	8.80**
cinnamon extract concentration	4	1.15*	82.69**	93.00**	49.73**

* Significant at 5 % level, ** Significant at 1 % level.

ตารางที่ 26 ค่าความแปรปรวนของปัจจัยต่างๆต่อการสนองของยีสต์

Table 26 ANOVA : overall effect of independent variables on response variable.

Independent variable	Sum of squares				
	df	*C. parapsilosis*	*Z. fermentati*	*K. marxianus*	*I. orientati*
Sucrose or Nacl concentration	4	11.45	10.21	8.26	3.83
pH	4	16.76*	31.75**	30.99**	12.86
clove extract concentration	4	56.76**	37.39**	41.94**	84.15*

* Significant at 5 % level, ** Significant at 1 % level.

ตารางที่ 27 ค่าความแปรปรวนของปัจจัยต่างๆต่อการสนองของยีสต์

Table 27 ANOVA: overall effect of independent variables on response variable.

Independent variable	Sum of squares				
	df	*C. parapsilosis*	*Z. fermentati*	*K. marxianus*	*I. orientati*
Sucrose or Nacl concentration	4	10.68	2.28	6.62	4.40
pH	4	47.66*	22.01	15.37	18.09
potassium sorbate concentration	4	43.91*	49.17*	71.18*	50.68*

* Significant at 5 % level, ** Significant at 1 % level.