บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำส้มคั้นและน้ำผักกาดดอง

3.1.1 ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำส้มเกล็ดหิมะ

น้ำส้มเกล็ดหิมะ จัดเป็นเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 ซึ่งน้ำส้มเกล็ดหิมะมีส่วนผสม คือ น้ำส้มคั้น เกลือ กรดมะนาว น้ำเชื่อม และน้ำแข็งยูนิต นำมาปั่นรวมกันให้ละเอียดจนขึ้นฟูบรรจุใส่ขวดพลาสติกหรือถ้วยพลาสติกที่ปิดสนิท เก็บไว้ในที่เย็น ตามประกาศฯ เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทจะต้องมีคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ ดังนี้ คือ ต้องตรวจไม่พบ ยีสต์และรา MPN Coliforms น้อยกว่า 2.2 และต้องไม่พบ *E. coli* และเชื้อก่อโรค จากการสุ่มเก็บน้ำส้มเกล็ดหิมะที่วางจำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 5 ยี่ห้อ มาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง และ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในรูปขององศาบริกซ์ และคุณภาพทางจุลินทรีย์โดยตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์ และราผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 คุณภาพทางเคมี และทางจุลินทรีย์ ของน้ำส้มเกล็ดหิมะ

Table 8 Chemical properties and microbial qualities of orange juice

Sample No	pH	Degree of Brix	Total bacteria (CFU/ml)	Total Yeasts (CFU/ml)	Total Molds (CFU/ml)
1	2.55	12	25	12	2
2	2.34	11	700	540	3
3	2.53	10	32	10	0
4	2.46	10	870	470	0
5	3.04	13	2100	430	0

จากผลการทดลอง ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำส้มเกล็ดหิมะ มีค่าอยู่ระหว่าง 2.34 ถึง 3.04 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 10 ถึง 13 องศาบริกซ์ ปริมาณเชื้อยีสต์ 10^1 ถึง 10^2 CFU/ml ซึ่งตามเกณฑ์กำหนดต้องตรวจไม่พบเชื้อยีสต์และรา ดังนั้นน้ำส้มเกล็ดหิมะทั้ง 5 ตัวอย่าง

จึงมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานตามเกณฑ์กำหนด และผู้ศึกษาจากการสำรวจน้ำส้มเกล็ดหิมะจำนวน 10 ยี่ห้อ ที่ผลิตและจำหน่ายในเขตภาคใต้ตอนบน พบว่า น้ำส้มเกล็ดหิมะมีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 2.37 ถึง 3.50 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 10 ถึง 16 องศาบริกซ์ จากการศึกษาของ วิสิฐ จะวะสิต และคณะ (2547) พบว่า น้ำส้มคั้นสดมีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 2.81 ถึง 3.77 และจากการศึกษาของ ลินจง สุขลำภู (2546) พบว่า น้ำส้มคั้นสดมีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.97 ถึง 4.10 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 11.60 ถึง 12.80 องศาบริกซ์ จำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 2.3 x 10^3 ถึง 3.1 x 10^4 CFU/ml และพบมียีสต์จำนวน 3.0 x 10^3 ถึง 2.9 x 10^4 CFU/ml ส่วนเชื้อราพบน้อยมาก ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่พบในน้ำส้มเกล็ดหิมะต่ำกว่าในน้ำส้มคั้นสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำส้มเกล็ดหิมะมีการเติมกรดมะนาวทำให้น้ำส้มเกล็ดหิมะความเป็นกรดสูงกว่าน้ำส้มค้นสด จึงทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบต่ำกว่าในน้ำส้มคั้นสดและพบเชื้อราเพียงเล็กน้อยเช่นกัน นอกจากนี้จากการสำรวจคุณภาพของน้ำส้มเกล็ดหิมะของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สุราษฎร์ธานี ปี 2546 พบจำนวนเชื้อยีสต์ อยู่ในระหว่าง 10^1 ถึง 10^3 CFU/ml พบเชื้อราเพียงเล็กน้อย และไม่พบการใช้วัตถุกันเสียชนิดซอร์บิกและเบนโซอิก ซึ่งการพบเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณจุลินทรีย์ธรรมชาติที่ปนเปื้อนบริเวณผิวส้มและสุขลักษณะที่ดีในการผลิต (Pao and Davis, 1999)

3.1.2 ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำผักกาดดอง

ผักกาดดอง คือ ผักกาดเขียวปลีล้างสะอาด ผึ่งแดดไว้ 2-3 ชั่วโมง เมื่อผักเหี่ยวบรรจุใส่ภาชนะสำหรับหมัก เติมน้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 3-5 ลงไปให้ท่วมผัก หมักทิ้งไว้ 1-2 สัปดาห์ จากการสุ่มเก็บน้ำผักกาดดองที่มีลักษณะเป็นฟิล์มยีสต์ขึ้นบนผิวหน้าที่วางจำหน่ายในตลาดสดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง และเปอร์เซนต์เกลือในรูปขององศาบริกซ์ และคุณภาพทางจุลินทรีย์โดยตรวจหาปริมาณแลกติกแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ผลดังแสดงในตารางที่ 9

จากผลการทดลอง ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำผักกาดดอง มีค่าอยู่ระหว่าง 3.32 ถึง 3.72 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 32 ถึง 42 องศาบริกซ์ จากการศึกษาของ Savard และคณะ (2002) พบว่าน้ำผักดองจะมีความเป็นกรดด่าง อยู่ระหว่าง 3.0 ถึง 4.0 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ของผักกาดดอง กำหนดให้ผักกาดดองมีความเป็นกรดด่างไม่เกิน 4.5 เนื่องจากผักกาดดองมีความเป็นกรดและมีความเค็มสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำผักกาดดอง คือ แบคทีเรีแลกติก และยีสต์ ซึ่งเมื่อเกิดการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกแล้วยีสต์กลุ่มฟิล์มยีสต์ สามารถเติบโตที่ผิวหน้าของน้ำเกลือและใช้กรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยการออกซิเดชัน ส่วนยีสต์กลุ่มเฟอร์เมนทีฟ สามารถเติบโตได้ในน้ำเกลือและหมักน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) จึงมักพบการปนเปื้อนของยีสต์ในน้ำผักกาด

ดอง และทำให้ผิวหน้าของผักกาดดองมีลักษณะเป็นฟิล์มยีสต์ในผักกาดดองที่ไม่ได้เติมวัตถุกันเสีย แต่จะไม่พบฟิล์มยีสต์ในผักกาดดองที่มีการเติมวัตถุกันเสีย

ตารางที่ 9 คุณภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์ของน้ำผักกาดดอง

Table 9 Chemical properties and microbial qualities of fermented brine

Sample No	pH	Degree of Brix	Lactic acid bacteria (CFU/ml)	Total Yeasts (CFU/ml)	Total Molds (CFU/ml)
1	3.32	32	$3.9x10^5$	$8.7x10^5$	0
2	3.72	38	$4.4x10^6$	$1.6x10^5$	0
3	3.34	42	$2.8x10^5$	$4.1x10^4$	0
4	3.42	36	$2.6x10^6$	$1.3x10^6$	0
5	3.35	42	$2.7x10^6$	$1.2x10^5$	0

3.1.3 การพิสูจน์สายพันธุ์ของยีสต์

เมื่อนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ 5 ตัวอย่างจำนวน 45 ไอโซเลท และยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำผักกาดดอง 5 ตัวอย่างจำนวน 45 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาถึงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง การเจริญ รูปร่างและการแบ่งเซลล์ในอาหารเหลว การสร้างเส้นใย และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จากผลการศึกษาสามารถจัดกลุ่มยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ ยีสต์กลุ่ม Y1 ยีสต์ในกลุ่มนี้ สร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่สร้างแอสโคสปอร์มีทั้งหมด 14 ไอโซเลท ยีสต์กลุ่ม Y2 ยีสต์ในกลุ่มนี้อาจจะสร้างหรือไม่สร้างเส้นใยเทียม สร้างแอสโคสปอร์มีทั้งหมด 12ไอโซเลท และยีสต์กลุ่ม Y3 เป็นยีสต์กลุ่มที่สร้างเส้นใยเทียมและสร้างแอสโคสปอร์มีทั้งหมด 9 ไอโซเลท รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์แต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 10 ส่วนที่เหลือไม่สามารถจัดกลุ่มได้และไม่ได้นำไปศึกษาต่อ ส่วนยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำผักกาดดอง สามารถจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ยีสต์กลุ่ม Y4 เป็นกลุ่มยีสต์ที่สร้างเส้นใยเทียม และสร้างแอสโคสปอร์ มีทั้งหมด 37 ไอโซเลท และยีสต์กลุ่ม Y5 กลุ่มในกลุ่มนี้ไม่สร้างเส้นใยเทียมและไม่สร้างแอสโคสปอร์ มีทั้งหมด 8 ไอโซเลท รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์แต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 10

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน มาศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา โดยการศึกษาความสามารถในการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต การใช้ประกอบไนโตรเจนและลักษณะอื่นๆ ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มียูเรียและการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลู บี ผลแสดงดังตารางที่ 4 ยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ โดยยีสต์ในกลุ่ม Y1 และY4 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ยีสต์ในกลุ่ม Y2 Y3 และ Y5 สามารถหมักน้ำตาลได้มากกว่าหนึ่งชนิด และ พบว่ายีสต์ทั้ง 5 กลุ่ม ไม่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรทได้ และเมื่อนำยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และการทำปฏิกริยากับสีไดอะโซเนียมบลู บี ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อแยกยีสต์กลุ่ม basidiosporogenous ออกจาก ascosporogenous พบว่า ยีสต์ทั้ง 5 กลุ่ม ไม่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและไม่ทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลู บี จากคุณสมบัติดังกล่าว สรุปได้ว่า ยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มเป็นยีสต์ในกลุ่ม ascosporogenous

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อยีสต์ เมื่อนำผลที่ได้มาเทียบกับอนุกรมวิธานของยีสต์ตาม The Yeast, A Taxonomic study, 4 th edition (Kurtzmam and Fell, 1998) และ Yeast characteristics and identification 3rd (Barnett *et al.*, 2000) สามารถพิสูจน์เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะในระดับจีนัสของยีสต์ทั้ง 3 กลุ่ม ได้เป็น 3 จีนัส คือ ยีสต์กลุ่ม Y1 พิสูจน์ได้เป็นจีนัส *Candida* sp. ยีสต์กลุ่ม Y2 พิสูจน์ได้เป็นจีนัส *Zygosaccharomyces* sp. และ ยีสต์กลุ่ม Y3 พิสูจน์ได้เป็นจีนัส *Kluyveromyces* sp. ส่วนยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง สามารถพิสูจน์เชื้อยีสต์ในระดับจีนัสของยีสต์ทั้ง 2 กลุ่ม ได้เป็น 2 จีนัส คือ ยีสต์กลุ่ม Y4 พิสูจน์ได้เป็นจีนัส *Issatchenkia* sp. และยีสต์กลุ่ม Y5 พิสูจน์ได้เป็นจีนัส *Candida* sp. เมื่อทำการศึกษาต่อถึงระดับสปีชีส์ โดยการศึกษาลำดับเบส ของ ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง 26s ของยีสตีทั้ง 5 จีนัส ผลการเทียบเคียงสายพันธ์ยีสต์แสดงดังตารางที่ 12 และภาพที่ 5 6 7 8 และ 9 (ภาคผนวก ค) จากผลการพิสูจน์ยีสจากลักษณะสัญฐานวิทยา สรีระวิทยา และลำดับเบสของ DNA สามาถพิสูจน์ยิสต์ 3 จีนัสที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะพบว่าสามารถพิสูจน์ยีสต์ได้เป็น 3 สปีชีส์ดังนี้ *Candida parapsilosis* *Zygosaccharomyces fermentati* และ *Kluyveromyces marxianus* ส่วนยีสต์ 2 จีนัสที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองสามารถพิสูจน์ยีสต์ได้เป็นสปีชีส์ *Issatchenkia orientalis* และ *Candida humilis*

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง

Table 10 Morphology of Yeasts Isolated from Orange Juice and Fermented Brine

Group of Yeasts	Number of Isolates	Description
Y1	14	white to cream , butyrous : vegetative reproduction by budding : simple or elaborate pseudohyphae : no sexual reproduction
Y2	12	white to cream , butyrous : vegetative reproduction by budding : none or simple pseudohyphae : persistent asci containing up to 4 smooth, round ascospores.
Y3	9	white to cream , butyrous : vegetative reproduction by budding : simple to elaborate pseudohyphae : evanescent asci containing up to 4 smooth, reniform ascospores.
Y4	37	white to cream , butyrous : vegetative reproduction by budding : simple or elaborate pseudohyphae : persistent asci containing up to 4 smooth, round ascospores.
Y5	8	white to cream , butyrous : vegetative reproduction by budding : none pseudohyphae : no sexual reproduction

สายพันธุ์ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะที่พบมากเป็นอันดับหนึ่ง คือ *C. parapsilosis* รองลงมาคือ *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ตามลำดับ และ *C. parapsilosis* และ *Z. fermentati* เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาจากน้ำส้มเกล็ดหิมะเกือบทุกตัวอย่าง ส่วน *K. marxianus* คัดแยกได้มาจากตัวอย่างน้ำส้มเกล็ดหิมะเพียงตัวอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ในจีนัส *Candida* ส่วนมากเป็นพวกไซโครไฟล์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตประมาณ 11 องศาเซลเซียส และไม่ชอบอุณหภูมิสูง ดังนั้นจะพบ *Candida* ในน้ำผลไม้ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำถึงร้อยละ 95 ของยีสต์ที่พบทั้งหมด (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537) Arias และคณะ (2002) พบว่า สายพันธุ์ของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำส้มคั้นที่ผ่านการพาสเจอร์ไรด์ คือ *C. intermedic* และ *C. parapsilosis* Efiuvwevwere และ Oyelude (1991 อ้างโดย Techango *et al*., 1997) คัดแยกยีสต์ *Candida* sp. ได้จากน้ำส้มคั้น ในประเทศไนจีเรีย Hatcher และ คณะ (อ้างโดย Arias *et al*, 2002) พบยีสต์สายพันธุ์

C. parapsilosis และ *Zygosacchamyces* ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำมะนาว พบยีสต์สายพันธุ์ *Z. fermentati* ในน้ำสตอเบอร์รีที่เน่าเสีย ในประเทศเกาหลีใต้ และในน้ำส้มคั้นในประเทศอิรัก (Barnett *et al.*, 2000) สำหรับยีสต์สายพันธุ์ *Kluyvervomyces* มักพบได้บ่อยในนมและผลิตภัณฑ์นม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537) โดยพบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์พวกเนยแข็งและโยเกิร์ต (Barnett *et al.*, 2000) แต่ยังไม่มีรายงานการพบยีสต์สายพันธุ์ *Kluyvervomyces* ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้

ตารางที่ 11 ลักษณะทางสรีระวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง

Table 11 Physiological Properties of Yeasts Isolated from Orange Juice and Fermented Brine

Group of Yeast	Fermentation of carbon compounds					Assimilation of nitrogen		Other characteristics	
	Glu	Su	Lac	Gal	Mal	KNO_3	$NaNO_2$	Urea hydrolysis	DDB reaction
Y1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2	+	+	-	_	-	-	-	-	-
Y3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Y4	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Y5	+	+	-	+	_	-	-	-	-

Glu = glucrose Su = sucrose Lac = lactose Gal = galactose Mal = maltose

DBB = diazonium blue B

+ = positive - = negative

ตารางที่ 12 ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดองโดยใช้ลำดับเบสของ 26s rDNA

Table 12 Identification of isolated yeasts strain from orange juice and fermented brine with 26s rDNA sequencing

Group of Yeasts	Genus	Gene	Percentage of Identity (Base pairs)
Y1	*Candida* sp.	*Candida parapsilosis* partial	99 (561/562)
		Candida parapsilosis strain EXOC16	99 (564/568)
		Candida sp. 36M 26s ribosomal RNA gene	99 (558/562)
		Candida sp. NRRL Y-17456 26S	99 (558/562)
		Candida parapsilosis partial	99 (557/562)
Y2	*Zygosaccharomyces* sp.	*Zygosaccharomyces* fermentati	99 (560/562)
		Zygosaccharomyces cidri 26S ribosomal RNA gene	98 (555/563)
		Zygosaccharomyces sp. IFO 11067 gene	98 (552/563)
		Zygosaccharomyces sp. IFO 11066 gene	96 (539/560)
Y3	*Kluyveromyces* sp.	*Kluyveromyces marxinus* strain EXOC1	98 (550/556)
		Kluyveromyces marxinus strain EXOC6	98 (550/556)
		Kluyveromyces marxinus strain UWF	98 (550/556)
		Kluyveromyces lactis strain NRRL	98 (550/556)
		Kluyveromyces marxinus strain CICY-KI	99 (539/543)
Y4	*Issatchenkia* sp.	*Issatchenkia orientlis* isolate 216	98 (570/577)
		Issatchenkia orientlis isolate 181	98 (570/577)
		Issatchenkia orientlis WL2002 26S	99 (559/562)
		Issatchenkia orientlis strain UWFT-210	99 (559/562)
		Issatchenkia orientlis isolate 149	99 (559/562)
Y5	*Candida* sp.	*Candida humilis* strain UWO (PS) 92-2	98 (546/553)
		Candida humilis 26S ribosomal RNA	98 (541/547)
		Candida humilis 26S ribosomal RNA	99 (529/534)

สายพันธุ์ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง สายพันธุ์หลักคือ *I. orientalis* สายพันธุ์รอง คือ *C. humilis* ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* คัดแยกได้มาจากน้ำผักกาดดอง 4 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ส่วน *C. humilis* คัดแยกได้มาจากตัวอย่างน้ำผักกาดดองเพียงตัวอย่างเดียว ศศิธร จินดามรกฎ (2543) ทำการพิสูจน์เชื้อยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย สายพันธุ์ของยีสต์ที่พบมากที่สุด คือ *I. orientalis* ที่แยกได้มาจากตัวอย่าง หน่อไม้ดอง หอยดอง มิโซ ข้าวหมาก มะม่วงดอง และองุ่นดอง เป็นต้น โดย วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2537) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida*

ทำให้ผักดองเกิดฝ้าขาว ได้แก่ *C. mycoderma* ทำให้เกิดฝ้าขาวในผักดองที่ใช้น้ำเกลือความเข้มข้นต่ำๆ และ *C. kruei* ทำให้เกิดฝ้าขาวในแตงกวาดอง

3.2 การศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์

3.2.1 สารสกัดพืชสมุนไพร

เมื่อนำพืชสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ กระเทียม หอม อบเชย กานพลู กะเพรา กะหล่ำปลี ข่า กระชาย กล้วยน้ำว้า บัวบก และฝรั่ง มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ น้ำ และ เอทานอล 95 % 500 มิลลิลิตร ในการสกัดใช้พืชสมุนไพรอบแห้ง 100 กรัม ซึ่งพืชสมุนไพรหลังอบแห้ง มีร้อยละของความชื้นอยู่ในช่วง 10.04 ถึง 29.28 เมื่อทำการสกัดสารและนำไประเหยจนแห้ง ร้อยละของสารสกัดที่ได้และร้อยละของความชื้นของสารสกัด แสดงดังตารางที่ 13 ร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชที่ใช้ เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 1.81 ถึง 53.25 และร้อยละความชื้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 7.0 ถึง 21.4 ส่วนร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชที่ใช้เมื่อใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 2.99 ถึง 14.96 และร้อยละความชื้นของสารสกัด มีค่าอยู่ในช่วง 17.5 ถึง 35.8 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของสารสกัดที่ได้พบว่าปริมาณสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำจะให้ค่าสูงสุดในขณะที่กระเทียมที่สกัดด้วยเอทานอลจะให้ปริมาณค่าต่ำสุด และพบว่ากานพลูจะให้ผลตรงข้ามกับกระเทียม โดยกานพลูที่สกัดด้วยน้ำจะให้ปริมาณร้อยละของสารสกัดต่ำสุดในขณะที่กานพลู ที่สกัดด้วยเอทานอลให้ค่าสูงสุด ซึ่งจากการสังเกตุ พบว่า ลักษณะของสารละลายของสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำ มีสีเหลือง ขุ่น เนื้อกระเทียมนิ่ม ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล สารละลายที่ได้มีสีเหลือง ใส เนื้อกระเทียมแข็งกรอบและลักษณะของสารละลายของกานพลูที่สกัดด้วยน้ำ มีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อกานพลูจับกันเป็นก้อน ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล สารละลายมีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อกานพลูละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของความชื้นของสารสกัดพบว่าร้อยละของความชื้นของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งร้อยละของความชื้นที่สูงกว่าน่าจะมาจากปริมาณน้ำที่ยังคงเหลืออยู่ในสมุนไพรอบแห้งที่นำมาสกัด และปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ใช้ซึ่งการทำให้แห้งโดยการนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศนั้นจะช่วยในการระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกไปได้หมด แต่ไม่สามารถระเหยน้ำออกไปได้ทั้งหมด สารสกัดสุดท้ายที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ในขณะที่สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำซึ่งสามารถระเหยน้ำออกไปได้ทั้งหมด สารสกัดที่ได้สุดท้ายจะมีลักษณะเป็นผง

ตารางที่ 13 ผลของการสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆโดยใช้น้ำและเอทานอล

Table 13 Aqueous and ethanolic extracts of herbs

Herbs	Solvents	% Yield (w/w dry)	Moisture Content of Herbal Extracts (%)
Garlic	H_2O	53.25	9.45
	95 % Ethanol	2.99	26.02
Onion	H_2O	48.84	13.65
	95 % Ethanol	14.41	26.54
Cinnamon	H_2O	12.26	11.31
	95 % Ethanol	7.47	20.11
Clove	H_2O	1.81	10.40
	95 % Ethanol	15.24	35.86
Holy basil	H_2O	7.54	14.85
	95 % Ethanol	4.26	28.35
Cabbage	H_2O	22.68	21.40
	95 % Ethanol	12.79	36.72
Galanga	H_2O	4.01	10.80
	95 % Ethanol	14.96	32.10
Boesenbergia	H_2O	4.45	12.10
	95 % Ethanol	5.12	28.55
Banana	H_2O	6.17	15.30
	95 % Ethanol	13.50	28.19
Asia pennywort	H_2O	16.14	7.00
	95 % Ethanol	6.11	19.11
Guava	H_2O	4.87	12.25
	95 % Ethanol	7.86	17.50

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยวิธี disc diffusion และ agar Dilution

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านยีสต์ของสารสกัดพืชสมุนไพร 11 ชนิด ยีสต์ที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ 3 สายพันธุ์ คือ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* และยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง 2 สายพันธุ์ คือ *I. orientalis* และ *C. humilis* และได้ศึกษาฤทธิ์ต้านยีสต์ของสารต้านจุลินทรีย์ชนิดโพแตสเซียมซอร์เบทด้วย

การศึกษาความไวต่อสารต้านยีสต์ในเบื้องต้นนั้น เลือกใช้วิธี disc diffusion โดยการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นดิสก์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ศึกษาและนำไปพิจารณาเลือกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านยีสต์เพื่อหาค่า MIC ต่อไป ผลการยับยั้งยีสต์ของสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อแผ่น โดยวิธี disc diffusion แสดงดังตารางที่ 14

สารสกัดพืชสมุนไพร 11 ชนิดที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่ามีสารสกัดพืชสมุนไพร 2 ชนิดที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ อบเชย และกานพลู ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Conner และ Beuchat (1984) พบว่า น้ำมันหอมระเหยของอบเชยและกานพลูทำให้บริสุทธิ์แล้วในระดับที่ให้ใช้ในอาหาร ที่ละลายในเอทานอล สามารถยับยั้งยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้ถึง 13 จีนัส ซึ่งมี 2 จีนัสที่เหมือนแต่สปีชีส์ต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ จีนัส *Candida lipolytica* และจีนัส *Kluyveromyces fragilis* แต่จากการศึกษาของ Conner และ Beuchat (1984) ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยของกระเทียม และหอม สามารถยับยั้งยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้ทั้ง 13 จีนัสและจากการศึกษาของ Kim และ Kyung (2003) พบว่าสารสกัดจากกระเทียมที่สกัดโดยการทำให้เอนไซม์อัลลิอินเนสไม่ทำงาน โดยนำกระเทียมที่หั่นแล้วนำมาลวกในน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ซึ่งสารอันลิอินในกระเทียมจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอัลลิซินออกไซด์ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถยับยั้งยีสต์ได้ถึง 6 สายพันธุ์ คือ *C. albicans C. utilis S. cerevisae P. membranefaciens Z. rouxii* และ *Z. bisporus*

จากการศึกษาของอภิราม ส่งศรี และ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล (2543) พบว่าสารสกัดพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดข่าเล็ก กระชาย ใบฝรั่ง บัวบกและกล้วยน้ำว้าดิบที่สกัดด้วยเอทานอล 95% โดยการแช่ชิ้นส่วนของพืชที่อบแห้งแล้วในเอทานอล เป็นเวลา 5 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ที่ก่อโรคชนิด *C. albicans* และ *C. neoformans* ได้ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้สารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดองได้

สารสกัดพืชสมุนไพร 11 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดองได้ แต่จากการศึกษาของ Araujo และคณะ (2003) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลกะเพราแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน สายพันธุ์ *M. officinalis* ซึ่งใช้พืชสดนำมาสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำสามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ *T. delbrueckii Z. bailii D. anomala P. membranifaciens* และ *Y. lipolytica* ได้ และจากการศึกษาของ Kyung และ Fleming (1997) พบว่าสารประกอบซัลเฟอร์ชนิด allyl isothiocyanate dimethyl trisufide methyl methanethiosulfonate และ methyl methanethiosulfinate ที่พบในกะหล่ำปลีสามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisae T. etchellsii H. mrakii* และ *P. membranefaciens* ได้ ซึ่งสารประกอบซัลเฟอร์ดังกล่าวได้มาจากการแตกตัวของสารตั้งต้นคือ S-methyl-L-cysteine sulfoxide ซึ่งสกัดได้จากกะหล่ำปลีที่ผ่านความร้อนโดยการนำมานึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนนำมาสกัด หรือสกัดแบบสดโดยการปั่นในตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50 : 50 (Kyung และ Fleming, 1994)

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า สารสกัดพืชสมุนไพร 9 ชนิด กระเทียม หอม กะเพรา กะหล่ำปลี ข่า กระชาย กล้วยน้ำว้า บัวบก และฝรั่ง ที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอล 95 % ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างหลักๆ ในเรื่องของแหล่งที่มาของพืชสมุนไพร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร และวิธีการที่ใช้ในการสกัดสาร จากการศึกษาในครั้งนี้ พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาจะเป็นสมุนไพรสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย เนื่องจากชนิดและปริมาณของสารสำคัญ จะแปรไปตาม ชนิดพืช พันธุ์พืช สภาพแวดล้อม เทคนิคการปลูกและการบำรุงรักษา ช่วงเวลาการเก็บและวิธีการเก็บเป็นต้น (ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา, 2536)

การเลือกใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร เนื่องจากตัวทำละลาย มีความสามารถในการสกัดสารออกมาได้แตกต่างกัน เช่น แป้ง โพลีเปปไทด์ และแลคตินละลายได้เฉพาะในตัวทำละลายน้ำ ส่วนโพลีอะเซททิลีน สเตอรอยด์ และโปรพอลีส ละลายได้เฉพาะในตัวทำละลายเอทานอล ส่วน แซนโทไซลิเนส แลคโทน และ ฟีโนน ละลายได้เฉพาะในตัวทำละลายเมทานอล แต่สารประกอบพวกแทนนินและเทอร์ปีนอยด์ สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด Cowan (1999) รายงานว่าสารประกอบบางชนิดละลายได้ในตัวทำละลายหลายชนิด แต่ปริมาณของสารที่ละลายได้อาจจะแตกต่างกัน Okeke และคณะ (2001) พบว่าการใช้ตัวทำลายชนิดเอทานอล น้ำเย็น น้ำร้อน ในการสกัดสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในพืช สารประกอบที่ถูกสกัดออกมาเป็นสารชนิดเดียวกัน แต่ปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในตัวทำละลายแต่ละชนิด ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันเนื่องจากสารประกอบต่างๆ จากพืช เช่น แอลคาลอยด์ แทนนิน ซาโปนิน สเตอรอยด์ กลัยคอน คาร์ดิแอ็ก

ตารางที่ 14 ผลการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดพืชสมุนไพร (ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อแผ่น) โดยวิธี disc diffusion

Table 14 Antiyeast activity of aqueous and ethanolic extracts of herbs (concentration 8 mg/disc) by disc diffusion.

Herbs	Extraction	Inhibition zone (mm)				
		C. parapsilosis	*Z. fermentati*	*K. marxianus*	*I. orientati*	*C. humilis*
Garlic	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Onion	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Cinnamon	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	19	19.5	16	12	12
Clove	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	25.5	24	21	17	19
Holy basil	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Cabbage	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Galanga	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Boesenbergia	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Banana	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Asia pennywort	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-
Guava	Aqueous	-	-	-	-	-
	Ethanolic	-	-	-	-	-

และ ไซยาโนเจนนีติก กลัยโคไซด์ มีความสัมพันธ์กันในการยับยั้งจุลินทรีย์

การเลือกใช้วิธีในการสกัดสารสำคัญ มีหลายวิธี สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เลือกการสกัดสารสำคัญโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด ซึ่งวิธีดังกล่าวนิยมใช้ในการศึกษาขั้นเบื้องต้นเพื่อค้นหาชนิดของพืชที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสารที่สกัดได้จะอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีการสกัดสารที่ไม่เหมือนกันเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลการศึกษาที่ได้ไม่สอดคล้องกันรวมทั้งในการศึกษาในครั้งนี้ อาจเลือกวิธีการสกัดสารสำคัญที่ไม่เหมาะสมกับพืชสมุนไพรบางชนิด ได้แก่ หอม กระเทียม และกะหล่ำปลี ซึ่งจากการศึกษาของ Corner และ Beuchat (1984) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของหอมและกระเทียมสามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ *C. lipolytica K. fragilis* และสายพันธุ์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ถึง 13 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าสารประกอบซัลเฟอร์ที่พบในกระหล่ำปลีสามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisae T. etchellsii P.membranefaciens* และ *H. mrakii* แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้การยับยั้งยีสต์ของสารสกัดหอม กระเทียม และกะหล่ำปลี ไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. parapsilosis Z. fermentati K. marxianus I. orientalis* และ *C. humilis* เนื่องจากการเตรียมพืชก่อนการสกัดจะเตรียมโดยการนำมาหั่นแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียสอาจทำให้เอนไซม์อัลลิอินเนสที่มีอยู่ในหอมและกระเทียมถูกทำลาย ซึ่งเอนไซม์อัลลิอินเนสที่อยู่นำกระเทียมจะถูกทำลายเมื่อนำกระเทียมที่หั่นแล้วมาลวกในน้ำเดือด นาน 5 นาที (Kyung *et al*., 2002) และเอนไซม์ ซิสเตอีน ซัลโฟไซด์ ไลเอส (cysteine sulfoxide lyase) ในกะหล่ำปลี จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส (Chin and Lindsay, 1994) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้การสกัดสารจากพืชสมุนไพรจะใช้เวลานานถึง 5 วัน อาจมีผลทำให้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์สามารถระเหยไประหว่างสารสกัด จึงทำให้สารสกัดที่ได้ไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาได้

นอกจากแหล่งที่มาของสมุนไพร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและวิธีการสกัดแล้ว สายพันธุ์ของยีสต์ที่แตกต่างกันจะให้ผลในการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธีการสกัดตามวิธีของ อภิราม ส่งศรีและ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล (2543) ซึ่งสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร 5 ชนิด คือ ข่า กระชาย บัวบก ฝรั่ง และกล้วยน้ำว้าดิบ สามารถยับยั้งยีสต์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *C. albicans* และ *C. neoformans* ได้ แต่สารสกัดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้ได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดองที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ได้

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถคัดเลือกสารสกัดพืชสมุนไพรได้ 2 ชนิด ที่สามารถยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือสารสกัดจากอบเชยและกานพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล Burt (2004) รายงานว่าสารประกอบที่พบในอบเชย

และมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ร้อยละ65 เป็นซินนามอลดีไฮด์ ส่วนในกานพลูร้อยละ 75-85 เป็นยูจีนอล Roller (1995) รายงานว่า กรดซินนามิค ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิค ที่พบในเครื่องเทศหลายชนิด รวมทั้งอบเชยจะละลายในเอทานอลและไม่ละลายในน้ำ Cerrutti (1996) รายงานว่าสารประกอบ ฟีนอลิคน่าจะเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์หลักที่พบในเครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหย เช่น ซิลนามิคอัลดีไฮด์จากอบเชย ยูจีนอล จากกานพลู อบเชยและเครื่องเทศอื่นๆ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase บนไซโตพลาสมิกเมมเบรนของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งจะรบกวนการส่งผ่านสารอาหาร ส่วนน้ำมันหอมระเหยจะทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของเซลล์ยีสต์และการสร้างพลังงาน นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยยังขัดขวางการซ่อมแซมเมตาบอลิซึ่มของเซลล์ยีสต์ที่บาดเจ็บ หรือโครงสร้างถูกทำลายโดยความร้อน จากการศึกษาของ Wendakoon และ Sakaguchi (1995) เกี่ยวกับกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยูจีนอลและซินนามอลดีไฮด์ พบว่า หมู่ไฮดรอกซิลของยูจีนอลจะจับกับโปรตีนซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ส่วนหมู่คาร์บอนิลของซิลนามอลดีไฮด์จะไปจับกับโปรตีนซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะมิโนแอซิด ดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylases)

เมื่อนำสารสกัดเอทานอลของอบเชยและสารสกัดกานพลู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาศึกษาฤทธิ์ต้านยีสต์โดยวิธี disc diffusion ผลดังแสดงในตารางที่ 15 สารสกัดอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่น สามารถยับยั้งยีสต์เฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ 3 สายพันธุ์ คือ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* (ภาพที่ 10 ภาคผนวก ค.) และที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 8 มิลลิกรัมต่อแผ่น จึงจะสามารถยับยั้งยีสต์ 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง คือ *I. orientalis* และ *C. humilis* ได้ (ภาพที่ 11 ภาคผนวก ค.) ส่วนสารสกัดกานพลูที่ระดับความเข้มข้นเพียง 2 มิลลิกรัมต่อแผ่น สามารถยับยั้งยีสต์ได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ภาพที่ 12 และ13 ภาคผนวก ค.)

นำสารสกัดเอทานอลของอบเชยและสารสกัดกานพลูซึ่งมีฤทธิ์ต้านยีสต์ โดยทำให้เกิดวงใส เมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution ผลแสดงดังตารางที่ 16 ค่า MIC ของสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งยีสต์ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* มีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า MIC ต่อการยับยั้งยีสต์ *I. orientalis* และ *C. humilis* มีค่าเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 14 ภาคผนวก ค.) ส่วนค่า MIC ของสารสกัดกานพลู ต่อการยับยั้งยีสต์ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* มีค่าเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ต่อการยับยั้ง ยีสต์ *I. orientalis* และ *C. humilis* มีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 15 ภาคผนวก ค.) สำหรับค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท มีค่าเท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ

K. marxianus และมีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* และ *C. humilis* (ภาพที่ 16 ภาคผนวก ค.) เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ของสารละลายทั้ง 3 ชนิดพบว่า ค่า MIC ในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง มีค่าสูงเป็น 2 เท่า ของยีสต์สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยจะมีค่า MIC ต่ำสุด รองลงมา คือ สาร โพแตสเซียมซอร์เบท และสารสกัดอบเชย ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดอบเชยและสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยเอทานอล และโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการยับยั้งยีสต์ โดยวิธี disc diffusion

Table 15 Ethanolic extracts of cinnamon, clove and potassium sorbate on antiyeast activity by disc diffusion method

Herbal extracts	Conc. mg/disc	Inhibition zone (mm)				
		C. parapsilosis	*Z. fermentati*	*K. marxianus*	*I. orientalis*	*C. humilis*
Cinnamon	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	4	13.5	15.5	13	-	-
	8	19	19.5	16	12	12
Clove	1	10	10	10	-	-
	2	18	14	15	15	16.5
	4	23.5	21	20	16	17.5
	8	25.5	24	21	17	19
Ethanol	95%	-	-	-	-	-

- = No inhibition zone

ตารางที่ 16 ค่า MIC การยับยั้งยีสต์ของสารสกัดอบเชยและกานพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท โดยวิธี Agar dilution

Table 16 Minimal inhibitory concentration (MIC) of ethanolic extracts of cinnamon and clove and potassium sorbate against five yeasts.

Herbal extracts	MIC (mg/ml)				
	C. parapsilosis	*Z. fermentati*	*K. marxianus*	*I. orientalis*	*C. humilis*
Cinnamon	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0
Clove	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0
Potassium sorbate	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8

3.3 การศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆต่อการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ

การศึกษาผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ การวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยๆ ด้วยวิธี General Response Surface Methodology (GRSM) โดยวางแผนการทดลองแบบ Partial Factorial Design และกำหนดจุดทดลองแบบ Central Composit Design โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาประกอบด้วย 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ (Box and Behnken , 1960) โดยทำการกำหนดรหัสของตัวแปรอิสระและรหัสของระดับของตัวแปร ดังตารางที่ 6 จากจำนวนปัจจัยและจำนวนระดับที่ทำการศึกษาสามารถกำหนดชุดการทดลองได้ 15 ชุดการทดลอง (Box and Behnken , 1960) ดังตารางที่ 7 และวัดการตอบสนองโดยวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยการนับจำนวนโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลในรูปของค่า log CFU/ml ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17-19 (ภาคผนวก ค)นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี PROC RSREG (response surface regression) ของสถาบัน SAS ปี 1996 เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดอบเชย สารสกัดกานพลู หรือโพแตสเซียมซอร์เบท ต่อการยับยั้งยีสต์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย แสดงดังตารางที่ 21-23 (ภาคผนวก ค) ค่าความแปรปรวน (ANOVA) แสดงดังตารางที่ 25-27 (ภาคผนวก ค) กราฟของการตอบสนองสำหรับแต่ละรูปแบบแสดงดังภาพที่ 1-3

3.3.1 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ในน้ำส้มเกล็ดหิมะ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

C. parapsilosis

$$Y1 = 2.58 - 0.27X_1 + 3.81X_2 - 1.30X_3 + 0.009X_1X_1 - 0.55X_2X_2 - 0.09X_3X_3 - 0.005X_1X_2 - 0.01X_1X_3 + 0.32X_2X_3$$

Z. fermentati

$$Y2 = 0.22 - 0.19X_1 + 3.68X_2 + 4.59X_3 + 0.004X_1X_1 - 0.40X_2X_2 - 3.64\ X_3X_3 + 0.02\ X_1X_2 - 0.004\ X_1X_3 - 1.16\ X_2X_3$$

K. marxianus

$$Y3 = -13.00 + 0.41X_1 + 10.76X_2 + 0.84X_3 - 0.006X_1X_1 - 1.17X_2X_2 - 0.95X_3X_3 + 001X_1X_2 + 0.01X_1X_3 - 1.96X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากอบเชยและพีเอชเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลน้อยที่สุด (ตารางที่ 25 ภาคผนวก ค) โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะลดลง (ภาพที่1) เมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่าง สารสกัดจากอบเชยและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์พบว่าเมื่อปรับพีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะจาก 2.5 เป็น 3.5 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งยีสต์ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus* จะเพิ่มขึ้นจาก 5.19×10^5 เป็น 2.88×10^6 CFU/ml 5.12×10^3 เป็น 1.34×10^4 CFU/ml และ 7.12×10^2 เป็น 6.06×10^4 CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 3.5 จะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 2.5 ในการยับยั้งยีสต์ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากัน ความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยที่ต้องใช้เพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 3.5 ต้องใช้สารสกัดอบเชยความเข้มข้นมากกว่า 1.6 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตรในการยับยั้ง *C. parapsilosis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับในน้ำส้มเกล็ดหิมะ พีเอช 2.5 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ที่พีเอช 3.5 ต้องใช้สารสกัดอบเชยความเข้มข้นประมาณ 1.1 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพีเอชสูงขึ้นความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *C. parapsilosis* จะสูงกว่าความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ทั้งนี้เนื่องจาก พีเอชมีผลต่อการยับยั้ง C. *parapsilosis* มากกว่าความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย ในขณะที่พีเอชมีผลต่อการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* น้อยกว่าความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย (ตารางที่ 25 ภาคผนวก ค)

3.3.2 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดกานพลูต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

C. parapsilosis

$$Y4 = -9.95 + 0.85X_1 + 7.18X_2 - 5.45X_3 - 0.045X_1X_1 + 1.50X_2X_2 + 1.14\ X_3X_3 + 0.02X_1X_2 - 0.018X_1X_3 + 0.62X_2X_3$$

Z. fermentati

$$Y5 = -26.43 + 0.86X_1 + 11.64X_2 + 9.94X_3 - 0.03X_1X_1 - 1.68X_2X_2 - 0.89\ X_3X_3 + 0.16\ X_1X_2 - 0.21\ X_1X_3 - 2.87\ X_2X_3$$

K. marxianus

$$Y6 = -17.65 + 0.23X_1 + 9.82X_2 + 6.02X_3 - 0.01X_1X_1 - 1.39X_2X_2 + 0.81X_3X_3 + 0.81X_1X_2 - 0.17X_1X_3 - 3.00X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากกานพลูและพีเอชเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลน้อยที่สุด (ตารางที่ 26 ภาคผนวก ค) โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะลดลง (ภาพที่2) เมื่อพิจารณาผล

ร่วมระหว่าง สารสกัดจากกานพลูและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์พบว่าเมื่อปรับพีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะจาก 2.5 เป็น 3.5 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งยีสต์ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus* จะเพิ่มขึ้นจาก 4.16×10^2 เป็น 1.51×10^3 CFU/ml 1.10×10^3 เป็น 1.36×10^4 CFU/ml และ 6.60×10^1 เป็น 1.00×10^3 CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มี พีเอช 3.5 จะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 2.5 ในการยับยั้งยีสต์ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากัน ความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูที่ต้องใช้เพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 3.5 ต้องใช้สารสกัดกานพลูความเข้มข้นมากกว่า 1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง *C. parapsilosis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับน้ำส้มเกล็ดหิมะพีเอช 2.5 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ที่พีเอช 3.5 ต้องใช้สารสกัดกานพลูความเข้มข้นประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อ พีเอชสูงขึ้นความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *C. parapsilosis* จะต่ำกว่าความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ทั้งนี้เนื่องจาก พีเอชมีผลต่อการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* มากกว่าความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู ในขณะที่พีเอชมีผลต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis* น้อยกว่าความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู (ตารางที่ 26 ภาคผนวก ค)

3.3.3 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

C. parapsilosis

$$Y7 = -11.68 + 2.01X_1 + 1.88X_2 - 3.54X_3 - 0.06X_1X_1 + 0.27X_2X_2 - 0.09\ X_3X_3 + 0.01X_1X_2 - 0.004X_1X_3 + 0.88X_2X_3$$

Z. fermentati

$$Y8 = 6.00 - 0.20X_1 + 0.77X_2 - 6.14X_3 + 0.01X_1X_1 + 0.15X_2X_2 + 1.52\ X_3X_3 + 0.03\ X_1X_2 - 0.11\ X_1X_3 - 0.40\ X_2X_3$$

K. marxianus

$$Y9 = 20.94 - 1.28X_1 - 3.37X_2 - 9.33X_3 + 0.04X_1X_1 + 0.99X_2X_2 + 2.58X_3X_3 + 0.08X_1X_2 - 0.01X_1X_3 - 0.15X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทและพีเอชเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *C. parapsilosis* ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลน้อยที่สุด (ตารางที่27 ภาคผนวก) และความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* รองลงมาคือ พีเอช และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลน้อยที่สุด โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะลดลง (ภาพที่3) เมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่างโพแตสเซียมซอร์เบทและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์พบว่าเมื่อปรับพีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะจาก 2.5 เป็น 3.5 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งยีสต์ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* จะเพิ่มขึ้นจาก 7.37×10^{6} เป็น 1.43×10^{8} CFU/ml 9.24×10^{1} เป็น 3.30×10^{3} CFU/ml และ 3.36×10^{-2} เป็น 7.88×10^{-1} CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 3.5 จะต้องใช้ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 2.5 ในการยับยั้งยีสต์ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากัน ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทที่ต้องใช้เพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 3.5 ต้องใช้โพแตสเซียมซอร์เบทความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง *C. parapsilosis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับน้ำส้มเกล็ดหิมะพีเอช 2.5 ที่มีความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ที่พีเอช 3.5 ต้องใช้โพแตสเซียมซอร์เบทความเข้มข้นประมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อพีเอชสูงขึ้นความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *C. parapsilosis* จะสูงกว่าความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ทั้งนี้เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis* มากกว่าความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท ในขณะที่พีเอชมีผลต่อการยับยั้ง *Z. fermentati* และ *K. marxianus* น้อยกว่าความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท (ตารางที่ 27 ภาคผนวก ค)

เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอช 2.5 และ 3.5 เติมสารสกัดอบเชยหรือสารสกัดกานพลู หรือโพแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า *C. parapsilosis* จะถูกยับยั้งโดยสารสกัดกานพลูได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดอบเชยและโพแตสเซียมซอร์เบทตามลำดับ ส่วน *Z. fermentati* และ *K. marxianus* จะถูกยับยั้งโดยโพแตสเซียมซอร์เบทได้ดีที่สุดรองลงมาคือ สารสกัดกานพลูและสารสกัดอบเชยตามลำดับ

จากการศึกษาผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และสารสกัดอบเชย กานพลูหรือโพแตสเซียมซอร์เบท ของน้ำส้มเกล็ดหิมะ ต่อการยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) ที่พีเอชและความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย สารสกัดกานพลูหรือโพแตสเซียมซอร์เบทเดียวกัน แต่องศาบริกซ์ต่างกันของน้ำส้มเกล็ดหิมะ การเจริญของยีสต์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสของน้ำส้มเกล็ดหิมะที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในช่วง 100 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือวัดเป็นองศาบริกซ์ได้อยู่ในช่วง 10 ถึง 20 องศาบริกซ์ และจะมีค่า a_w ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.99 ถึง 1.00 ซึ่งจากการศึกษาของ Praphailong และ Fleet (1997) พบว่ายีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 30 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 50 ค่า a_w มากกว่า 0.92 และสามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันที่พีเอช 3.0 5.0 และ 7.0 เกือบทุกสายพันธุ์ และจากการศึกษาของ Tokuoka (1993) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Z. rouxii* สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 1.8 ถึง 8.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโครสสูง ซึ่งกลไกการทนน้ำตาลของยีสต์เกิดจากการสร้างและสะสมสารประกอบโพลีออล ได้แก่ กลีเซอรอล อะราบิทอล แมนนิทอล และอีริทริทอล เป็นต้นและยังสัมพันธ์กับองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase (Praphailong and Fleet, 1997) ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสของน้ำส้มเกล็ดหิมะ จึงมีผลต่อการเจริญของยีสต์เพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญสอดคล้องกับการศึกษาของ Bettey คณะ (2002) ซึ่งพบว่าน้ำตาล 8 ถึง 16 องศาบริกซ์ เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่ พีเอชและความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท และโซเดียมเบนโซเอท เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae Z. bailii* และ *C. lipolytoca* ในเครื่องดื่ม แต่จากการศึกษาของ Cole และ Keenan (1987 อ้างโดย Battey *et al.,* 2002) พบว่าในเครื่องดื่มที่มีองศาบริกซ์ อยู่ในช่วง 20 ถึง 50 องศาบริกซ์จะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ *Z. bailii* อย่างมีนัยสำคัญ

พีเอชและความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยหรือความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ ($P< 0.05$) ซึ่งพีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้อยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 โดยสอดคล้องกับการศึกษยของ

Praphailong และ Fleet (1997) พบว่ายีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 30 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 2.0 ถึง 8.0 และยีสต์สายพันธุ์ *K. marxianus* สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุด เท่ากับ 4.0 ใน inorganic buffer และ 2.5 ใน citrate phosphate buffer ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่พีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะเท่ากับ 2.0 ที่ทุกองศาบริกซ์ และที่ทุกความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย สารสกัดกานพลู และโพแตสเซียมซอร์เบท พบว่ายีสต์ *K. marxianus* ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้เพียงเล็กน้อยในขณะที่ *C. parapsilosis* และ *Z. fermentati* สามารถเจริญได้ดีกว่า แสดงว่า *K. marxianus* สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่สูงกว่า *C. parapsilosis* และ *Z. fermentati* จากการคัดแยกและพิสูจน์เชื้อยีสต์จะพบ *K. marxianus* เฉพาะในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มี พีเอชสูงกว่า 3.0 เท่านั้น ในขณะที่ *C. parapsilosis* และ *Z. fermentati* สามารถเจริญได้ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอชต่ำกว่า 3.0

การทำงานร่วมกันของพีเอชและสารสกัดอบเชยหรือสารสกัดกานพลูในน้ำส้มเกล็ดหิมะต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอชต่ำๆ สารสกัดอบเชย และสารสกัดกานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าที่พีเอชสูงๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณกรดซิตริกที่ใช้เติมลงไปเพื่อปรับพีเอชที่อยู่ในรูปไม่ แตกตัว จะเพิ่มขึ้นและจะแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้พีเอชภายในไซโตพลาสซึมของจุลินทรีย์เปลี่ยนไป (Battey *et al*, 2002) และสารประกอบซินนามอลดีไฮด์และยูจีนอลซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิคที่พบในสารสกัดอบเชยและสารสกัดกานพลู เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นและมีความคงตัว (Lopez-Malo *et al*, 1997) และจากการศึกษาของ Juven และ คณะ (1994) ที่พีเอชต่ำๆ สารประกอบ ฟีนอลิค จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงสามารถจับกับตำแหน่งที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนเซลล์เมมเบรนทำให้สามารถละลายส่วนที่เป็นไขมันของเซลล์เมมเบรนได้ดีกว่า อาจกล่าวได้ว่าสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิคที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่อยู่ในรูปแตกตัว

พีเอชและความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท มีผลต่อการเจริญอย่าง มีนัยสำคัญเฉพาะกับ *C. parapsilosis* แต่พีเอชมีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการศึกษาใช้ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทในช่วงที่สูงเกินไป ทำให้ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทมีผลต่อการเจริญของ *Z. fermentati* และ *K. marxianus* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่พีเอชมีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่สำหรับ *C. parapsilosis* ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเป็นยีสต์ที่สามารถทนต่อโพแตสเซียมซอร์เบทได้ดีกว่า *Z. fermentati* และ *K. marxian*us มาก ดังแสดงในตารางที่ 11 จึงทำให้พีเอชมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของ *C. parapsilosis* ด้วย และจากการศึกษาของ Lopez-Malo และ คณะ (2005) พบว่า พีเอชจะมีผลต่อการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากธรรมชาติน้อยกว่าสารกันเสียชนิดสารเคมี แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ พีเอชของน้ำส้มเกล็ดหิมะลดลงโพแตสเซียมซอร์เบทจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ได้เพิ่มขึ้น

ทั้งนี้เนื่องจากกรดและเกลือของกรดซอร์บิกจะมีกรดชนิดไม่แตกตัวสูงขึ้นเมื่อพีเอชลดลงซึ่งโมเลกุลที่ไม่แตกตัวของกรดจะป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งการใช้สารอาหารต่างๆ เช่น กรดอะมิโนฟอสเฟต กรดอินทรีย์ต่างๆเป็นต้น (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

3.4 การศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆต่อการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง

การศึกษาผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง การวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยๆ ด้วยวิธี General Response Surface Methodology (GRSM) โดยวางแผนการทดลองแบบ Partial Factorial Design และกำหนดจุดทดลองแบบ Central Composit Design โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาประกอบด้วย 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ (Box and Behnken , 1960) โดยทำการกำหนดรหัสของตัวแปรอิสระและรหัสของระดับของตัวแปร ดังตารางที่ 6 จากจำนวนปัจจัยและจำนวนระดับที่ทำการศึกษาสามารถกำหนดชุดการทดลองได้ 15 ชุดการทดลอง (Box and Behnken , 1960) ดังตารางที่ 7 และวัดการตอบสนองโดยวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยการนับจำนวนโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลในรูปของค่า log CFU/ml ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 20 (ภาคผนวก ค) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี PROC RSREG (response surface regression) ของสถาบัน SAS ปี 1996 เพื่อประเมินผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดอบเชย สารสกัดกานพลู หรือโพแตสเซียมซอร์เบท ต่อการยับยั้งยีสต์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย แสดงดังตารางที่ 24 (ภาคผนวก ค) ค่าความแปรปรวน (ANOVA) แสดงดังตารางที่ 25-27 (ภาคผนวก ค) กราฟของการตอบสนองแสดงดัง ภาพที่ 4

3.4.1 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้ง *I. orientalis*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

I. orientalis

$$Y10 = -21.17 + 0.41X_1 + 13.02X_2 - 6.01X_3 - 0.006X_1X_1 - 1.82X_2X_2 + 0.001\ X_3X_3 - 0.01\ X_1X_2 + 0.01\ X_1X_3 + 0.85\ X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์ *I. orientalis*

X_1 คือ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากอบเชยและพีเอชเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* ขณะที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลน้อยที่สุด (ตารางที่ 25 ภาคผนวก ค) โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำผักกาดดองลดลง (ภาพที่4) เมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่าง สารสกัดจากอบเชยและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* พบว่าเมื่อปรับ พีเอชของน้ำผักกาดดองจาก 3.2 เป็น 3.8 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *I. orientalis* จะเพิ่มขึ้นจาก 8.81×10^5 เป็น 2.69×10^6 CFU/ml ดังนั้นในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 จะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 3.2 ในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากัน ในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 ต้องใช้สารสกัดอบเชยความเข้มข้น 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับในน้ำผักกาดดองพีเอช 3.2 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.2 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดกานพลูต่อการยับยั้ง I*. orientati*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

I. orientalis

$$Y11 = 93.54 - 2.64X_1 - 22.48X_2 - 20.85X_3 + 0.03X_1X_1 + 4.00X_2X_2 + 12.28\ X_3X_3 - 0.08\ X_1X_2 + 0.029\ X_1X_3 - 0.67\ X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์ *I. orientalis*

X_1 คือ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากกานพลูเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* รองลงมาคือ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลน้อยที่สุด (ตารางที่ 26 ภาคผนวก ค) โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำผักกาดดองลดลง (ภาพที่4) เมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่าง สารสกัดจากกานพลูและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* พบว่าเมื่อปรับ พีเอชของน้ำผักกาดดองจาก 3.2 เป็น 3.8 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *I. orientalis* ปริมาณการเหลือรอดของ *I. orientalis* จะเพิ่มขึ้นจาก 1.0×10^{-1} เป็น 1.97×10^{0} CFU/ml ดังนั้นในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 ต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 3.2 ในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 ต้องใช้สารสกัดกานพลูความเข้มข้น 1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับในน้ำผักกาดดองพีเอช 3.2 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดกานพลู 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.3 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และโพแตสเซียมซอร์เบทต่อยับยั้ง *I. orientalis*

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อประเมินผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ สามารถเขียนสมการกำลังสอง (second order polynomial) ได้ดังนี้

I. orientalis

$$Y12 = 107.91 - 3.13X_1 - 26.43X_2 - 6.88X_3 + 0.04X_1X_1 + 4.49X_2X_2 + 1.95\ X_3X_3 - 0.031\ X_1X_2 + 0.013\ X_1X_3 - 0.84\ X_2X_3$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณของยีสต์ *I. orientalis*

X_1 คือ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท

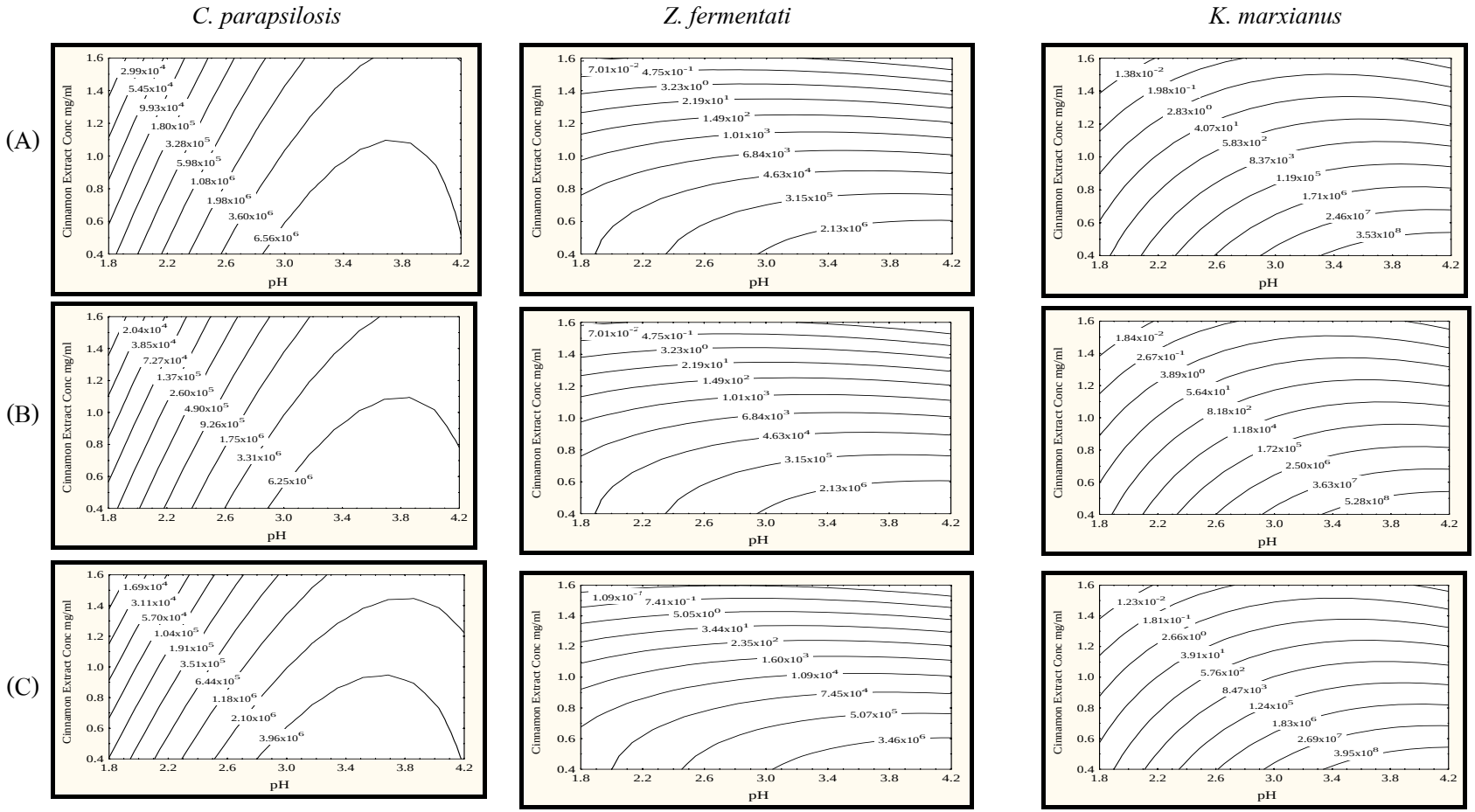
จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* รองลงมาคือ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลน้อยที่สุด (ตารางที่ 27 ภาคผนวก ค) โดยพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้น

เมื่อความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทเพิ่มขึ้นขณะที่พีเอชของน้ำผักกาดดองลดลง (ภาพที่4) เมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่างโพแตสเซียมซอร์เบทและพีเอชต่อความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* พบว่าเมื่อปรับพีเอชของน้ำผักกาดดองจาก 3.2 เป็น 3.8 แล้วเติมสารสกัดอบเชย 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้ง *I. orientalis* ลดลง โดยปริมาณการเหลือรอดของ *I. orientalis* เพิ่มขึ้นจาก 3.2 เป็น 3.8 ปริมาณการเหลือรอดของ *I. orientalis* จะเพิ่มขึ้นจาก 5.12×10^{1} เป็น 3.29×10^{3} CFU/ml ดังนั้นในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 จะต้องใช้ความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท เพิ่มขึ้นมากกว่าที่พีเอช 3.2 ในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.8 ต้องใช้สารโพแตสเซียมซอร์เบท 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้ง *I. orientalis* ให้เหลือรอดในปริมาณที่เท่ากันกับในน้ำผักดองพีเอช 3.2 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดโพแตสเซียมซอร์เบท 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญ *I. orientalis* ในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอช 3.2 และ 3.8 และเติมสารสกัดอบเชย หรือ สารสกัดกานพลู หรือโพแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า *I. orientalis* สามารถเจริญได้น้อยที่สุดในน้ำผักกาดดองที่เติมสารสกัดกานพลู รองลงมาคือโพแตสเซียมซอร์เบทและสารสกัดอบเชยตามลำดับ

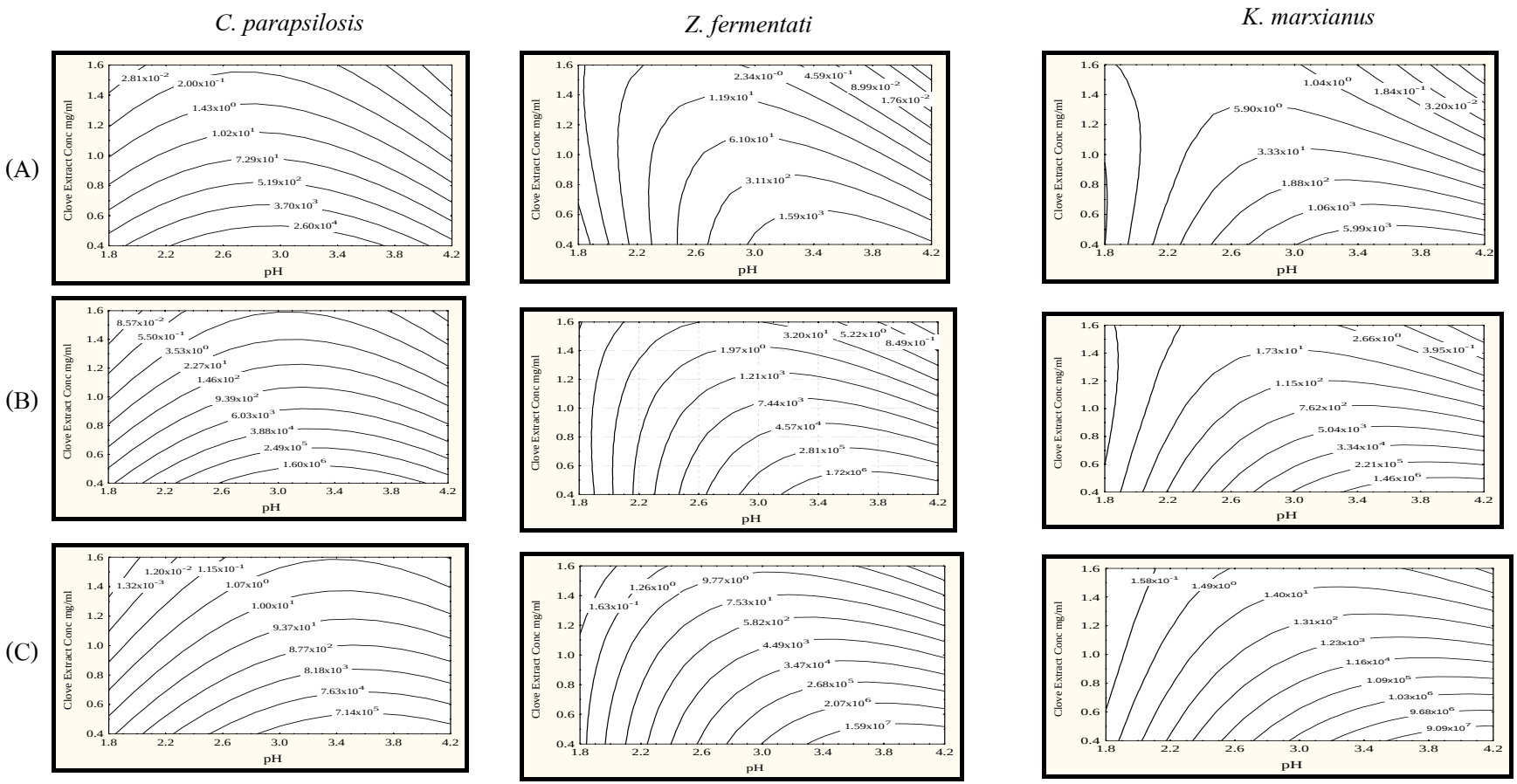
จากการศึกษาผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และสารสกัดอบเชย สารสกัดกานพลูหรือโพแตสเซียมซอร์เบท ของน้ำผักกาดดอง ต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* พบว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) ที่พีเอช และความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย กานพลูหรือโพแตสเซียมซอร์เบทเดียวกันแต่องศาบริกซ์ของน้ำผักกาดดองต่างกัน การเจริญของยีสต์ไม่แตกต่าง ซึ่งความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ของน้ำผักกาดดองที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในช่วงร้อยละ 3.0 ถึง 4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือวัดเป็นองศาบริกซ์ได้อยู่ในช่วง 32 ถึง 42 องศาบริกซ์ และจะมีค่า a_w ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.98 ถึง 0.99 ซึ่งจากการศึกษาของ Praphailong และ Fleet (1997) พบว่ายีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 30 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ที่พีเอช 2.0 ยีสต์ส่วนมากเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ ที่พีเอช 3.0 และ 5.0 ยีสต์ทั้ง 30 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่เข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และจากการศึกษาของ Betts คณะ (1996) พบว่ายีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 13 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่เข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.8 ถึง 8.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ขึ้นกับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังนั้นความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำผักกาดดอง ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จึงมีผลต่อการเจริญของยีสต์เพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ และจากการศึกษาของ Parent และ คณะ (1998) พบว่า

พีเอช และไนซิน เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญของ *L. monocytogenes* ในขณะที่เกลือโซเดียมคลอไรด์และ EDTA เป็นปัจจัยรองที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ



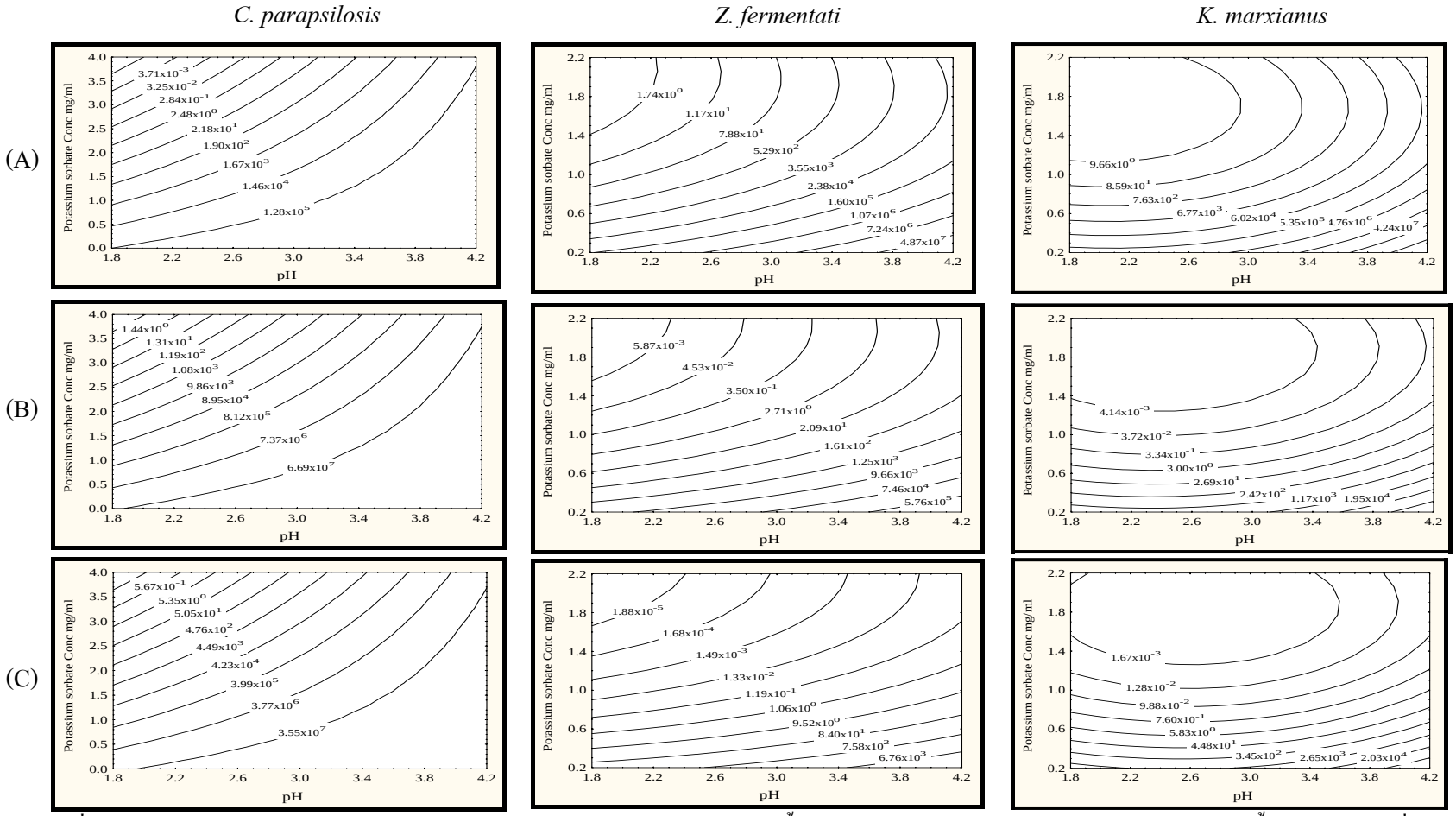
ภาพที่ 1 กราฟผลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* ในน้ำส้มเกล็ดหิมะ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็นค่าคงที่ (A) = 10 ^{0}Brix (B) = 15^{0}Brix (C) = 20 ^{0}Brix

Fig. 1 Contour plots showing combined effect of pH and cinnamon concentration on the growth of *C. parapsilosis, Z. fermentati* and *K. marxianus* in orange juice solutions under constant sucrose (^{0}Brix) ; (A) = 10 ^{0}Brix, (B) = 15^{0}Brix, (C) = 20 ^{0}Brix



ภาพที่ 2 กราฟผลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* ในน้ำส้มเกล็ดหิมะ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็นค่าคงที่ (A) = 10 ^{0}Brix (B) = 15^{0}Brix (C) = 20 ^{0}Brix

Fig. 2 Contour plots showing combined effect of pH and clove concentration on the growth of *C. parapsilosis, Z. fermentati* and *K. marxianus* in orange juice solutions under constant sucrose (^{0}Brix) ; (A) = 10 ^{0}Brix, (B) = 15 ^{0}Brix, (C) = 20 ^{0}Brix



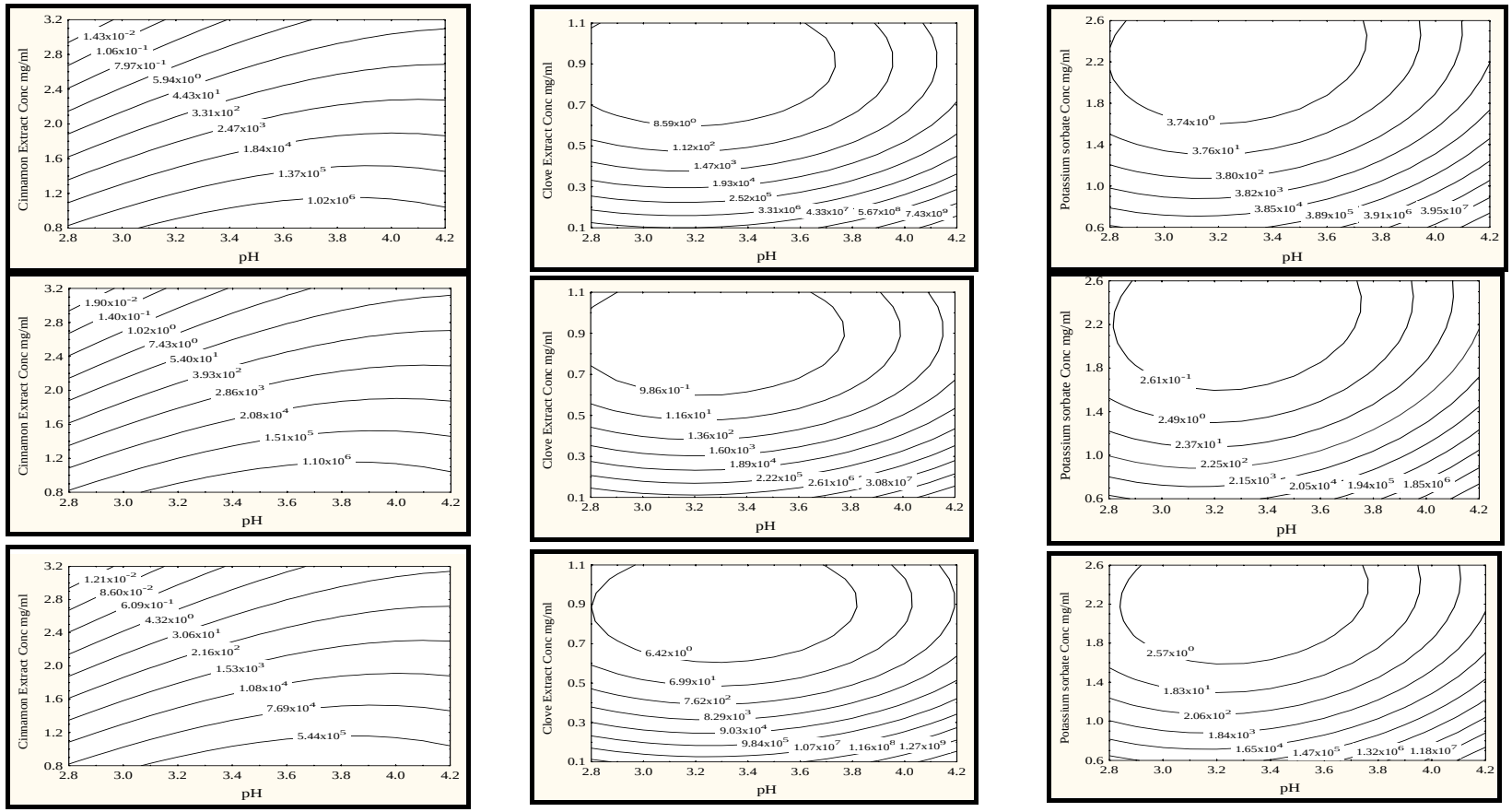
ภาพที่ 3 กราฟผลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการยับยั้ง *C. parapsilosis Z. fermentati* และ *K. marxianus* ในน้ำส้มเกลี็ดหิมะ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็นค่าคงที่ (A) = 10 ^{0}Brix (B) = 15^{0}Brix (C) = 20 ^{0}Brix

Fig. 3 Contour plots showing combined effect of pH and potassium sorbate concentration on the growth of *C. parapsilosis, Z. fermentati* and *K. marxianus* in orange juice solutions under constant sucrose (^{0}Brix) ; (A) = 10 ^{0}Brix, (B) = 15 ^{0}Brix, (C) = 20 ^{0}Brix

(A)

(B)

(C)



ภาพที่ 4 กราฟผลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของสารสกัดอบเชย กานพลู และโพแตสเซียมซอร์เบท ต่อการยับยั้ง *I.orientalis* ในน้ำส้มเกลือหิมะ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นค่าคงที่ (A) = 10 ^{0}Brix (B) = 15^{0}Brix (C) = 20 ^{0}Brix

Fig. 4 Contour plots showing combined effect of pH and cinnamon, clove and potassium sorbate concentration on the growth of *I.orientalis* in fermented brine solutions under constant NaCl (^{0}Brix) ; (A) = 32 ^{0}Brix, (B) = 37 ^{0}Brix, (C) = 42 ^{0}Brix