บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 ตัวอย่างอาหารที่นำมาแยกชื้อยีสต์

2.1.1.1 น้ำส้มคั้น ชนิดน้ำส้มเกล็ดหิมะ เก็บจากแหล่งจำหน่าย ในเขต อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ 1 เก็บจากหน้าโรงเรียนอาชีวะ

ตัวอย่างที่ 2 เก็บจากตลาดสดเทศบาลเมือง

ตัวอย่างที่ 3 เก็บจากตลาดสี่แยกอนามัย

ตัวอย่างที่ 4 เก็บจากตลาดศาลเจ้า

ตัวอย่างที่ 5 เก็บจากหมู่บ้านมนันยา

โดยเก็บตัวอย่างละ 5 หน่วย

2.1.1.2 น้ำผักกาดดอง เก็บจากแหล่งจำหน่าย ในเขต อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ 1 เก็บจากตลาดสดนิคมซอย 2

ตัวอย่างที่ 2 เก็บจากตลาดสี่แยกอนามัย

ตัวอย่างที่ 3 เก็บจากตลาดสดเทศบาลเมือง

ตัวอย่างที่ 4 เก็บจากตลาดโพธิ์หวาย

ตัวอย่างที่ 5 เก็บจากตลาดสดนิคมซอย 10

โดยเก็บตัวอย่างตลาดละ 1 ตัวอย่าง

2.1.2 ชนิดของพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่น 11 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและพิสูจน์เชื้อยีสต์ (รายละเอียดในภาคผนวก)

- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)
- Yeast extract-malt extract (YM)
- Yeast extract peptone dextrose agar (YPD)
- Fowell ‘s acetate agar

- Gorodkowa agar
- 5% Malt extract agar
- Mc Clary acetate agar
- Fermentation basal medium
- Liquid medium for nitrogen assimilation test
- Christensen's urea agar
- Sabouraud's 4 % glucose – 0.5% yeast extract
- Yeast carbon base

ตารางที่ 5 ชนิดของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

Table 5 Type of herbs used in this study

Scientific name	Common name	ชื่อไทย	Plant parts
Allium sativium Linn	Garlic	กระเทียม	Fruit
Allium cepa	Onion	หอมแดง	Fruit
Cinnamomum zeylanicum Breyn	Cinnamon	อบเชย	Stem
Eugenia aromatica Baill	Clove	กานพลู	Flower
Ocimum tenuiflorum Linn	Holy basil	กะเพรา	Leave
Brassica oleracea	Cabbage	กะหล่ำปลี	Leave
Alpinia nigra (Gaerth.)B.L.Burlt.)	Galanga	ข่า	Root
Boesenbergia pandurata(Roxb.)Schltr.	Boesenbergia	กระชาย	Root
Musa sapientum Linn.	Banana	กล้วยน้ำว้า	Fruit
Centella asiatica Linn. Urban	Asia pennywort	บัวบก	Leave
Psidium guajava Linn.	Guava	ฝรั่ง	Leave

2.1.4 สารเคมี

- เอทานอล 95% บริษัท สรรพสามิต
- โพแตสเซียมซอร์เบท บริษัท Fluka
- กรดซิตริก บริษัท Fluka
- โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Merck
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck
- ไดอะโซเนียม บลู บี บริษัท Fluka
- น้ำตาลทรายขาว บริษัท มิตรผล

2.2 อุปกรณ์

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น MR 23i ยี่ห้อ Jouan
- เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Evaporator) รุ่น R-114 ยี่ห้อ Buchi
- ตู้ปลอดเชื้อลมเป่า รุ่น Safe/Maxi Safe 2010 ยี่ห้อ Holten
- เครื่องวัดเปอร์เซ็นต์เกลือ (Refractometer) รุ่น Buffalo, NY ยี่ห้อ Leica
- เครื่องวัดองศาบริกซ์ (Refractometer) รุ่น ATC-1E ยี่ห้อ Atago
- ตู้อบลมร้อน รุ่น VD ยี่ห้อ WTB binder
- เครื่องบดปั่น (Blender) รุ่น 327 ยี่ห้อ Moulinette
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB 29 ยี่ห้อ Memmert
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HV-85 ยี่ห้อ Hirayama
- ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (Low Tempurator Incubator) รุ่น MIR-253 ยี่ห้อ Sanyo
- ชุดกรอง ยี่ห้อ Millipore
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BX40 ยี่ห้อ Olympus
- เครื่องนับโคโลนี รุ่น 560 ยี่ห้อ Suntex
- เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง รุ่น LP 1200S ยี่ห้อ Sartorius
- เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 P ยี่ห้อ Sartorius
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) รุ่น U-3000/U-3300 ยี่ห้อ Hitachi
- เครื่องวัดความเป็นพีเอช รุ่น 20 ยี่ห้อ Denver
- เครื่องดูดปล่อยอัตโนมัติ (Autopipette) ยี่ห้อ Biohit
- เตาไฟฟ้าพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็ก รุ่น SLK 6 ยี่ห้อ Schott

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำส้มคั้นและน้ำผักกาดดอง

2.3.1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำส้มเกล็ดหิมะ ที่วางจำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บจากแหล่งจำหน่าย 5 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 5 ขวด แบ่งสุ่มเก็บไว้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาเชื้อยีสต์ รา และแบคทีเรีย แล้วนำน้ำส้มเกล็ดหิมะส่วนที่เหลือ วัดค่าพีเอชและองศาบริกซ์

สุ่มเก็บน้ำผักกาดดอง ที่วางจำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จากแหล่งจำหน่าย 5 แหล่ง แบ่งสุ่มเก็บไว้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาเชื้อยีสต์ รา และแบคทีเรีย ส่วนที่เหลือนำมาวัดค่าพีเอชและองศาบริกซ์

2.3.1.2 การแยก ยีสต์ รา และ แบคทีเรีย ในน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง (Deak and Beuchat, 1993)

เตรียมสารละลายน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดองให้มีความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-5} ด้วยน้ำเปปโตนร้อยละ 0.1 ดูดตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อเทอาหารวุ้นแข็ง PDA พีเอช 3.5 เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนียีสต์และราทั้งหมด สุ่มเลือกโคโลนียีสต์ โดยเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีของยีสต์เดี่ยวๆ ที่มีลักษณะการเจริญบนอาหารวุ้นแข็งแตกต่างกัน ประมาณ 10 โคโลนีต่อตัวอย่างมาทำ wet mount ด้วยน้ำกลั่น นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า เลือกเฉพาะโคโลนีที่เป็นยีสต์และเขี่ยเชื้อลงบนอาหารวุ้นแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งเอียง YPD โคโลนีละ 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปพิสูจน์หาสายพันธุ์ยีสต์ต่อไป ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกใช้วิธีการ pour plate บนอาหารวุ้นแข็ง PCA และ MRS ตามลำดับ บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

2.3.1.3 การพิสูจน์เชื้อยีสต์

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบเคียงประเภทของยีสต์ ทำตามวิธีในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th edition (Kurtzman และ Fell, 1998) โดยนำยีสต์ที่คัดแยกไว้ในข้อ 2.3.1.2 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาทดสอบลักษณะต่างๆ ดังนี้

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์

1) Vegetative cell and cultural characteristics

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยสังเกตสีและลักษณะโคโลนี และศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว รวมทั้งสังเกต ลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการแตกหน่อของยีสต์ โดยนำเชื้อยีสต์มาเขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นแข็ง YM และถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยวิธี Dalmau plate technique เพาะยีสต์บนอาหารวุ้นแข็ง YPD โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากเป็นเส้นตรงและทำการแตะเชื้อที่ปลายทั้งสองด้านของเส้นตรงในจานเพาะเชื้อเดียวกันปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อ บ่มเพาะเชื้อที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน ตรวจการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

2) Sexual reproduction โดยการเพาะยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อ 4 ชนิด คือ Fowell's acetate agar Gorodkowa agar 5% malt extract agar และ Mc Clary acetate agar โดยการเขี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างแอสโคสปอร์ ที่เวลา 7 14 และ 21 วัน โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา

1) การหมักสารประกอบคาร์บอน นำยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 ลูป ลงในอาหาร fermentation medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 6 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ร้อยละ 2 โดยมีโบรโมไทมอลบลู เป็นอินดิเคเตอร์ และมีหลอดดักก๊าซ Durham's tube อยู่ด้วย บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของโบรโมไทมอลบลูจากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้กรด และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน นอกจากความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสแล้ว ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ กาแลกโตส ซูโครส มอลโตส และแลกโตส ซึ่งการเตรียมอาหาร fermentation medium โดยใช้แหล่งน้ำตาลดังกล่าวแสดงดังภาคผนวก ก

2) การใช้สารประกอบไนโตรเจน เลี้ยงยีสต์บนอาหารวุ้นแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อไปเลี้ยงในหลอดที่มี yeast carbon base ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast carbon base ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ โพแตสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนไตรท์ โดยใช้อาหาร yeast carbon base ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต เป็น positive control ส่วน yeast carbon base ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเป็น negative control บ่มเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการใช้ไนโตรเจนทุกๆ 2 วันจนครบ 15 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์บนอาหาร yeast carbon base ที่เป็น positive control negative control และ yeast carbon base ที่เติมแหล่งไนโตรเจน เพื่อดูความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

การศึกษาลักษณะอื่นๆ

1) การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส เขี่ยยีสต์ลงบนอาหารวุ้นแข็งเอียง Christensen's urea ที่มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอินดิเคเตอร์ ถ้ายีสต์นั้นสามารถสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอสได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีส้มจางเป็นสีชมพูเข้ม

2) การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียม บลู บี เพาะเชื้อยีสต์โดยวิธีแตะเชื้อ ลงบนอาหารแข็ง Sabouraud's 4 % glucose – 0.5% yeast extract บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงจากนั้นเท DBB reagent จนท่วมโคโลนีของยีสต์ สังเกต ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ถ้ายีสต์นั้นทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเดียมบลูบีได้โคโลนีจะมีสีแดงเข้มหรือแดงม่วง ภายใน 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ยีสต์ที่ทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเดียมบลูบีได้ คือ ยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous

เมื่อทดสอบลักษณะต่างๆแล้วนำผลที่ได้มาเทียบกับอนุกรมวิธานตาม The Yeast, A Taxonomic study, 4 th edition (Kurtzmam และFell, 1998**)** และ Yeast characteristics and identification 3rd (Barnett *et al.*, 2000) คัดเลือกเชื้อยีสต์จีนัสที่พบมากเป็นอันดับ 1 และ 2 จากทั้งน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง เก็บไว้ในอาหาร YPDA slant และส่งให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ทำการพิสูจน์เชื้อยีสต์ในระดับสปีชีส์ โดยการทำ DNA sequencing 26S 500 basepair

การทำ DNA sequencing โดยการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ในส่วนของ 26S rDNA ด้วยโพลีเมอร์เรสเชนรีแอคชัน (polymerase chain reaction, PCR) และทำ sequencing reaction ด้วย PCR จากนั้นอ่านลำดับเบสด้วยเครื่อง automate sequencing นำลำดับเบสที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกันฐานข้อมูลเพื่อหาชนิดของ DNA ของยีสต์ (Wang *et al*., 2003 and Wu *et al*., 2003)

2.3.2 การศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์

2.3.2.1 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร (อภิราม ส่งศรี และ คณะ, 2545)

การสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ

นำส่วนของพืชที่จะใช้ในการสกัดทั้ง 11 ชนิด มาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น แล้วนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ชั่งมา 100 กรัม แช่ในน้ำ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (อภิราม ส่งศรี และคณะ, 2545) นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดเอาส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำไปทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่องเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ นำสารสกัดมาหาร้อยละของความชื้น เก็บในขวดเก็บสารขนาดประมาณ 20 มิลลิลิตรและเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 %

นำส่วนของพืชที่จะใช้ในการสกัดทั้ง 11 ชนิด มาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง หาร้อยละของความชื้น แล้วนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ชั่งมา 100 กรัม แช่ในเอทานอล 95 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมากรองด้วยผ้าขาวบางแล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดเอาส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดใส่ขวดเก็บสารขนาดประมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในตู้ระเหยสุญญากาศอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 คืน นำสารสกัดมาหาร้อยละของความชื้นและเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพร (อรพรรณ ริยาพันธ์, 2546 และ อภิราม ส่งศรี และคณะ, 2545)

สารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ

นำสารสกัดพืชสมุนไพรจากการสกัดด้วยน้ำเป็นตัวทำละลายมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ stock solution ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจเช็คการปลอดเชื้อ โดยนำสารสกัดไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อปนเปื้อนในสารสกัดนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน (pore size) 0.45 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรที่ได้เจือจางครั้งละ 2 เท่า (two- fold dilution) โดยให้มีความเข้มข้น 200 100 50 และ25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้น 40 20 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอล 95 %

นำสารสกัดพืชสมุนไพรจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำมาละลายใน 95% เอทานอล ให้ได้ stock solution ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับสารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ

2.3.2.3 การเตรียมแผ่นดิสค์ ที่จะใช้ในการทดสอบ

นำสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพร และสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท จากข้อ 2.3.2.2 แต่ละความเข้มข้นๆ ละ 40 โมโครลิตร หยดลงบนแผ่นดิสค์ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร วางทิ้งไว้ให้แห้ง สำหรับแผ่นดิสค์ ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95 % แทนสารสกัด

2.3.2.4 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ (ดัดแปลงจาก อรพรรณ ริยาพันธ์, 2546**)**

เขี่ยเชื้อยีสต์ จากอาหารวุ้นแข็งเอียงจากข้อ 2.3.1.2 มา 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อที่บ่มไว้มา 10 % ใส่ลงในอาหารเหลวใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง เชื้อเจริญจะอยู่ในระยะช่วง log phase นำเชื้อในระยะนี้มาเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้าย 10^5 CFU/ml แล้วนำมาใช้ทดสอบการยับยั้งยีสต์โดยสารสกัดพืชสมุนไพร

2.3.2.5 การทดสอบการยับยั้งเชื้อยีสต์ของสารสกัดพืชสมุนไพรโดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996 อ้างโดย เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และวัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล, 2542)

นำยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นแข็ง YPD ปริมาตร 12 มิลลิลิตรที่หลอมแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เขย่าให้ผสมกัน แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำแผ่นดิสค์ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.3 วางบนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผล โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์ ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

2.3.2.6 การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี Agar dilution (ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996 อ้างโดย เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และวัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล, 2542)

ผสมสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพร หรือสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท แต่ละความเข้มข้น จากข้อ 2.3.2.1 กับอาหารวุ้นแข็ง YPD หลอมเหลวในอัตราส่วน 1:100 (สารละลาย : YPD) เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำความเข้มข้นละ 2 จานหยดเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.4 เชื้อละ 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^3 CFU/ml ลงบนอาหาร จำนวน 5 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายสกัดที่เชื้อยีสต์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC สำหรับชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95% แทนสารสกัด

คัดเลือกสารสกัดสมุนไพร ชนิดที่ให้ผลในการยับยั้งยีสต์ได้ดีที่สุด โดยให้ ค่า MIC ต่ำที่สุด จำนวน 2 ชนิด และมีกลิ่นที่ไม่รุนแรง มาใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

2.3.3 ศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะและน้ำผักกาดดอง

การออกแบบการทดลอง

การวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย 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 และวัดการตอบสนองโดยวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใช้ทดสอบ

2.3.3.1 ผลร่วมระหว่างพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และสารสกัดพืชสมุนไพรหรือโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการเจริญเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ (*C. parapsilosis* *Z. fermentati* และ *K. marxianus*)

การกำหนดระดับตัวแปรอิสระในการศึกษาได้จากการสำรวจพีเอชและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำส้มเกล็ดหิมะ พบว่า พีเอช มีค่าอยู่ในช่วง 2.3 ถึง 3.7 และ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 12 ถึง 17 องศาบริกซ์ ส่วนระดับความเข้มข้นของสารสกัดพืชสมุนไพร จากการทดลองในเบื้องต้นเป็นการออกแบบการทดลองเหมือนการทดลองจริง โดยใช้ค่า MIC ของสารแต่ละชนิดมาพิจารณาในการเลือกระดับของความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาเพื่อเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพืชสมุนไพรและโพแตสเซียมซอร์เบทในการยับยั้งยีสต์แต่ละสายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ของสารละลายสกัดอบเชย อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกานพลู 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นของโพแตสเซียมซอร์เบท 0.4 ถึง 3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบเชื้อ *C. parapsilosis* และความเข้มข้น 0.4 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *Z. fermentati* และ *K. marxianus* ดังนั้นระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคือ

	พีเอช	2.0	3.0	4.0	
	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์)	10	15	20	(Refractometer)
	(ซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	100	160	220)	(HPLC)
	สารละลายสารสกัดอบเชย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.5	1.0	1.5	
หรือ	สารละลายสารสกัดกานพลู (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.5	1.0	1.5	
หรือ	โพแตสเซียมซอร์เบท (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.4	2.0	3.6	(*C. parapsilosis*)
		0.4	1.2	2.0	(*Z. fermentati* และ *K. marxianus*)

วิธีการทดสอบ

นำน้ำส้มเกล็ดหิมะที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษเบอร์1 แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน (pore size 0.45) มาปรับองศาบริกซ์ด้วยน้ำกรองหรือสารละลายน้ำตาลทรายที่ปลอดเชื้อ ให้เป็น 10 15 และ 20 องศาบริกซ์ แล้วนำน้ำส้มเกล็ดหิมะที่แต่ละองศาบริกซ์มาปรับพีเอช ด้วยกรดซิตริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 2.0 3.0 และ 4.0 หลังจากนั้นนำน้ำส้มเกล็ดหิมะที่เตรียมได้มาเติมสารละลายสารสกัดอบเชย กานพลูและโพแตสเซียมซอร์เบท ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆตามตารางที่ 7 เมื่อเติมสารละลายเรียบร้อยแล้ว จะได้สารละลายทั้งหมด 15 ชุดการทดลอง นำสารละลายแต่ละชุดการทดลองแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1.8 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำมาเติมเชื้อยีสต์แต่ละชนิด หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 10^5 CFU/ml นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา pour plate ด้วย อาหารวุ้นแข็ง YPD บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็ง YPD รายงานผลในรูปของค่า Log CFU/ml นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอชเท่ากับ 3.0 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 15 องศาบริกซ์ ไม่เติมสารสกัดอบเชย กานพลู และโพแตสเซียมซอร์เบท

2.3.3.2 ผลร่วมระหว่าง พีเอช ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และสารสกัดพืชสมุนไพรหรือโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์ *I. orientalis* ที่แยกได้จาก น้ำผักกาดดอง

การกำหนดระดับตัวแปรอิสระในการศึกษาได้จากการสำรวจพีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำผักกาดดองที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน ขุ่น มีฟิล์มยีสต์ขึ้นบนผิวหน้า พบว่า พีเอชมีค่าอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 4.0 และ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 32 ถึง 42 หนึ่งส่วนในพันส่วน (PPT) สำหรับระดับความเข้มข้นของสารสกัดพืชสมุนไพรได้จากการทดลองในเบื้องต้นซึ่งเป็นการออกแบบการทดลองเหมือนการทดลองจริงโดยใช้ค่า MIC ของสารแต่ละชนิดมาพิจารณาในการเลือกระดับของความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาเพื่อเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพืชสมุนไพรและโพแตสเซียมซอร์เบทในการยับยั้งยีสต์โดยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดอบเชยอยู่ในช่วง 0.8 ถึง 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กานพลู 0.2 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและโพแตสเซียมซอร์เบท 0.8 ถึง 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคือ

	พีเอช	3.0	3.5	4.0	
	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (หนึ่งส่วนในพันส่วน (PPT))	32	37	42	(Refractometer)
	(โซเดียมคลอไรด์ (%น้ำหนักต่อปริมาตร)	3.0	3.5	4.0)	(Titration method)
	สารละลายสารสกัดอบเชย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.8	2.0	3.2	
หรือ	สารละลายสารสกัดกานพลู (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.2	0.6	1.0	
หรือ	โพแตสเซียมซอร์เบท (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.8	1.2	2.4	

วิธีการทดสอบ

นำน้ำผักกาดดองที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน (pore size 0.45) มาปรับปริมาณของแข็งทีละลายได้ทั้งหมด ด้วยน้ำกรองหรือสารละลายน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อ ให้เป็น 32 37 และ 42 แล้วนำน้ำผักกาดดองที่ระดับปริมาณของแข็งทีละลายได้ทั้งหมดต่างๆ มาปรับพีเอชด้วยกรดซิตริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 3.0 3.5 และ 4.0 หลังจากนั้นนำน้ำผักกาดดองที่เตรียมได้มาเติมสารละลายสารสกัดอบเชย กานพลู และสารละลายโพแตสเซียมซอร์เบท ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตามตารางที่ 7 เมื่อเติมสารละลายเรียบร้อยแล้ว จะได้สารละลายทั้งหมด 15 การทดลอง นำสารละลายแต่ละการทดลองแบ่งใส่หลอดทดลอง

หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร นำมาเติมเชื้อยีสต์ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 10^5 CFU/ml นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา pour plate ด้วยอาหารวุ้นแข็ง YPD บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็ง YPD รายงานผลในรูปของค่า Log CFU/ml นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยมีชุดควบคุม คือ น้ำผักกาดดองที่มีพีเอชเท่ากับ 3.5 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 37 องศาบริกซ์ ไม่เติมสารสกัดอบเชย กานพลู และโพแตสเซียมซอร์เบท

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลใช้วิธี PROC RSREG (response surface regression) ของสถานบัน SAS ปี 1996 เพื่อประเมินผลของตัวแปรอิสระ (พีเอช น้ำตาลซูโครส และสารกัดพืชสมุนไพรหรือโพแตสเซียมซอร์เบท) ต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มเกล็ดหิมะ และศึกษาผลของตัวแปรอิสระ พีเอช เกลือโซเดียมคลอไรด์ และสารสกัดพืชสมุนไพรหรือโพแตสเซียมซอร์เบทต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง โดย RSREG เป็นสมการถดถอยกำลังสองที่มีลักษณะกราฟเป็นเส้นโค้งที่สามารถทำนายแนวโน้มของข้อมูลได้

$$Y = \beta_{ko} + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=1}^{3} \beta_{kij} x_{ij} x_i$$

เมื่อ β_{ko} β_{ki} และ β_{kij} คือค่า constant coefficients และ X_i เป็นรหัสของตัวแปรอิสระ ค่า regression coefficients (β_{ko}, β_{k1}, β_{k2},..., β_{k9}) ที่ได้สามารถนำไปเขียนกราฟ contour plot ของค่าการตอบสนอง ซึ่ง contour plot ของการตอบสนองสำหรับ model นี้สามารถวาดออกมาได้โดยใช้ Statistica for Windows version 5.0 โดยการ plot ค่าของตัวแปรอิสระ สองตัวที่มีผลต่อค่าการตอบสนองมากที่สุด และรองลงมา ส่วนตัวแปรอิสระที่มีผลน้อยที่สุดจะให้เป็นค่าคงที่

ตารางที่ 6 การออกแบบการทดลองแบบ Fractional factorial

Table 6 Fractional factorial design for selected parameters for survival of Yeasts

Independent variables	Coded	Uncoded	Coded	Uncoded
Sucrose / NaCl	X_1	Sucrose / NaCl	1	Maximum
			0	Medium
			-1	Minimum
pH	X_2	pH	1	Maximum
			0	Medium
			-1	Minimum
Herbal extracts / Potassium sorbate	X_3	Herbal extracts / Potassium sorbate	1	Maximum
			0	Medium
			-1	Minimum

ที่มา : Box และ Behnken (1960)

ตารางที่ 7 ข้อมูลการทดลองสำหรับการวิเคราะห์การตอบสนองแบบ 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ

Table 7 Experimental data for the three-factor, three level response surface analysis

	Sucrose or NaCl	pH	Herbal extract or Potassium sorbate
Treatment	X_1	X_2	X_3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

ที่มา : Box และ Behnken (1960)