ผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ของไคโตซาน

อัญชลี ทวีสุจินันท์สกุล [1] นภาพร เชี่ยวชาญ [2] และ องอาจ วัฒนชัยยิ่งยง [3]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 12 ตุลาคม 2547 ตอบรับเมื่อ 18 มกราคม 2548

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเหลว (Potato Dextrose Broth, PDB) ที่ pH 4.5 และ 3.5 ณ อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายไคโตซานและปรับ pH จากการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร PDB ที่ pH ทั้ง 2 ระดับ อย่างไรก็ตาม ที่ pH 3.5 พบค่า Lag time เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญลดลงและจำนวนเซลล์สูงสุดลดลง เมื่อเติมไคโตซานลงในอาหารเหลวพบกราฟการเจริญเปลี่ยนเป็นกราฟการรอดชีวิต โดยที่ pH 4.5 ยีสต์ลดลง 3.43 และ 5.07 Log_{10} ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไคโตซาน 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่ pH 3.5 พบการลดลงของยีสต์ 5.98 Log_{10} แต่ไม่พบการเจริญในอาหารเหลวที่มีไคโตซาน 2 กรัมต่อลิตร สำหรับผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสภายในเวลา 17 วัน ยีสต์มีการเจริญอย่างช้าๆ ในอาหารเหลวที่ pH 4.5 ในขณะที่ pH 3.5 ยีสต์ลดลงอย่างช้าๆ 0.54 Log_{10} เมื่อเติมไคโตซานลงในอาหาร พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นและ pH ลดลงเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยที่ pH 4.5 จำนวนยีสต์ลดลง 1.72 และ 3.73 Log_{10} และที่ pH 3.5 จำนวนยีสต์ลดลง 4.21 และ 5.49 Log_{10} ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไคโตซาน 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหารได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำ

คำสำคัญ : กรดอะซิติก / ไคโตซาน / pH / *Saccharomyces cerevisiae* / อุณหภูมิ

---

[1] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร*

[2] *อาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร*

[3] *นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา*

Effect of pH and Temperature on the Yeast Inhibitory Activity of Chitosan

Unchalee Taweesujinunsakul [1], Naphaporn Chiewchan [2], and Ongart Wathanachaiyingyong[3]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 12 October 2004 ; accepted 18 January 2005

Abstract

The inhibitory effect of chitosan on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in laboratory liquid medium (Potato Dextrose Broth, PDB) was investigated at pH 4.5 and 3.5 and at the temperatures of 30 and 4°C, respectively. Acetic acid was used for preparation of chitosan solution and for adjusting the pH. At 30°C, the growth curves were observed for *S. cerevisiae* grown in PDB at both pH values. However, longer lag time, slower growth rate and lower maximum cell numbers were found for the growth at pH 3.5. The survival curves were observed when chitosan solution was added to the media. At pH 4.5, the yeast numbers were reduced by 3.43 and 5.07 $\log_{10}$ after 72 h of exposure to 1 and 2 g/l of chitosan. At pH 3.5, 5.98 $\log_{10}$ reduction was obtained in the medium containing 1 g/l of chitosan and no growth was observed in the medium containing 2 g/l of chitosan. The effect of storage temperature, 4°C, was also investigated for 17 days. The slow growth was exhibited at pH 4.5 and slow reduction (0.54 Log_{10} reduction) was found for the growth at pH 3.5. Similar to the results at 30°C, antifungal effects on the yeast were more pronounced at higher chitosan concentration and lower pH value. The results illustrated that chitosan may be used in combination with temperature and low pH to inhibit the spoilage yeast contaminated in food products.

Keywords : Acetic acid / Chitosan / pH / *Saccharomyces cerevisiae* / Temperature

[1] *Graduate Student, Department of Food Engineering.*

[2] *Lecturer, Department of Food Engineering.*

[3] *Scientist, Department of Microbiology.*

1. บทนำ

ไคโตซานเป็นสารโพลิแซกคาไรด์ที่ได้จากการดัดแปลงโครงสร้างของไคติน [1] ซึ่งสกัดได้จากเปลือกกุ้งและกระดองปู ปัจจุบันได้มีการนำไคโตซานและอนุพันธ์มาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งทางด้านแพทย์ สิ่งแวดล้อม การเกษตร การประมง รวมถึงด้านอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกาย สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ [2] ได้มีการนำไคโตซานมาใช้เป็นอาหารเสริม ฟิล์มเคลือบอาหาร และช่วยตกตะกอนน้ำผลไม้ นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้มีการทดลองนำไคโตซานและอนุพันธ์ไปประยุกต์ใช้กับอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อวัวบด [3] ลูกกวาด [4] หอยนางรม [5] นมยูเอชที [1] นมสเตอริไลซ์ [6] น้ำแอปเปิ้ล [7-8] มายองเนสและสลัดกุ้ง [9] ผลิตภัณฑ์หมูแช่เย็น เช่น หมูบด ไส้กรอกหมู [10] พบว่าได้ผลดีในการชะลอการเจริญของจุลินทรีย์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานเนื่องมาจากไคโตซานสามารถจับที่บริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์จุลินทรีย์โดยก่อตัวเป็นชั้นบางๆ รอบเซลล์ ซึ่งเป็นการขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการเลือกผ่านของเซลล์สูญเสีย ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด เช่น ชนิดและอนุพันธ์ของไคโตซาน ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ชนิดและองค์ประกอบของอาหาร สารถนอมอาหารอื่น รวมถึง pH และอุณหภูมิ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า Chitosan glutamate สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ pH 4.5 ได้ดีกว่าที่ pH 5.2 [7] ชี้ให้เห็นว่าการใช้ pH ต่ำร่วมกับไคโตซานมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีขึ้น นอกจากนี้เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับอุณหภูมิต่ำจะช่วยเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น น้ำแอปเปิ้ลที่เติมไคโตซานที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์บางสายพันธุ์ได้ [8] และการเคลือบเนื้อกุ้งด้วย Chitosan glutamate สามารถชะลอการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสได้ตลอดระยะเวลาการศึกษา 28 วัน [9] อย่างไรก็ตาม การศึกษาปัจจัยร่วมกันระหว่าง pH และอุณหภูมิต่ำที่มีต่อการยับยั้งยีสต์ยังมีไม่เพียงพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) โดยศึกษาผลของไคโตซาน 0, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร pH 4.5 และ 3.5 ที่อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นแนวทางในการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน

เตรียมสารละลายไคโตซาน (stock solution) เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (Food grade บริษัททีซียูเนี่ยน ประเทศไทย) โดยชั่งไคโตซานหนัก 2.0000±0.0010 กรัม ละลายด้วยกรดอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ (บริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำมากวนผสมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกสาร (Hitachi รุ่น CR-21 ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายที่ได้ไว้เป็น stock solution ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

2.2 การเก็บรักษาและการเตรียมยีสต์เพื่อใช้ในการทดลอง

นำยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar slant (บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษา stock culture ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เซลล์ยีสต์สำหรับการทดลองเตรียมโดยนำยีสต์ที่เจริญบนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมาเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยยีสต์มา 1 loop ถ่ายลงในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick รุ่น G24 ประเทศสหรัฐอเมริกา) ก่อนนำไปศึกษาในขั้นต่อไป (จำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ 1.10 x 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร)

2.3 การยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยไคโตซานที่ pH 4.5 และ 3.5

นำไคโตซาน 20 กรัมต่อลิตร (stock solution) มา 5 และ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ PDB 95 และ 90 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ได้อาหารที่มีความเข้มข้นของไคโตซานเท่ากับ 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 4.33 และ 4.25 ตามลำดับ โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Schott gerate รุ่น CG 840B ประเทศเยอรมัน) ปรับความเป็นกรดของอาหารให้มี pH เท่ากับ 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลต่อลิตร สำหรับที่ pH 3.5 ปรับความเป็นกรดของอาหารด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Control ใช้กรดอะซิติกปริมาตรเท่ากันโดยไม่เติมไคโตซาน นำอาหารไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นปิเปต *S. cerevisiae* อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญในอาหาร PDB (จากข้อ 2.2) 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ต้องการทดสอบ (จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.10-1.50 x 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนยีสต์ด้วยวิธี standard plate count บนอาหาร PDA โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

2.4 การยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยไคโตซานที่ pH 4.5 และ 3.5

เตรียมอาหารสำหรับการวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 2.3 สำหรับการวิเคราะห์การเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Edison รุ่น Innova 4230 NJ ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำการทดลองเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างอาหารมาตรวจนับจำนวนยีสต์ทุกๆ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี standard plate count โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Excel ตลอดการทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำสำหรับแต่ละสภาวะของการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร PDB ที่ 30 และ 4 องศาเซลเซียส

การทดลองนี้ได้นำสมการของ Zwietering และคณะ [11] มาใช้อธิบายการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ใน PDB (pH 5.0) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยที่พารามิเตอร์หรือค่าคงที่ของการเจริญ (growth parameter) ซึ่งได้แก่ λ, μ_m และ A สามารถหาได้จากสมการที่ 1 คือ

$$\ln S(t) = \ln\left(\frac{N}{N_o}\right) = A \times \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \times e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

โดยที่ λ (Lag time) หาได้จากจุดตัดของความชันของกราฟไปที่แกน X (เวลา), μ_m (maximum specific growth rate) แสดงการเจริญจำเพาะสูงสุดซึ่งหาได้จากความชันของกราฟ และ A (Asymptote) คือค่าการเจริญสูงสุดของยีสต์

ผลการเจริญของ *S. cerevisiae* ใน PDB ที่มี pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 1(ก) และค่าพารามิเตอร์การเจริญแสดงในตารางที่ 1 *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีใน PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยพบลักษณะการเจริญมีรูปร่างคล้ายตัว S (Sigmoid curve) และแบ่งการเจริญได้ 3 ช่วงคือ ช่วง Lag phase (λ) เป็นช่วงที่ยีสต์ปรับตัวในอาหารใหม่ทำให้ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จำนวนยีสต์คงที่ภายใน 0.17±0.01 วัน (4.11±0.01 ชั่วโมง) ของการศึกษา ช่วงที่สองคือ Log phase หรือ Exponential phase ยีสต์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยกราฟมีความชันเพิ่มขึ้นในช่วงที่สองของการเจริญ ระยะนี้ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ โดยมีค่า μ_m เท่ากับ 7.80±0.80 (วัน$^{-1}$) จากนั้นยีสต์จะเข้าสู่ช่วง Stationary phase อัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้มีค่าการเจริญสูงสุด (*A*) เท่ากับ 4.33±0.13

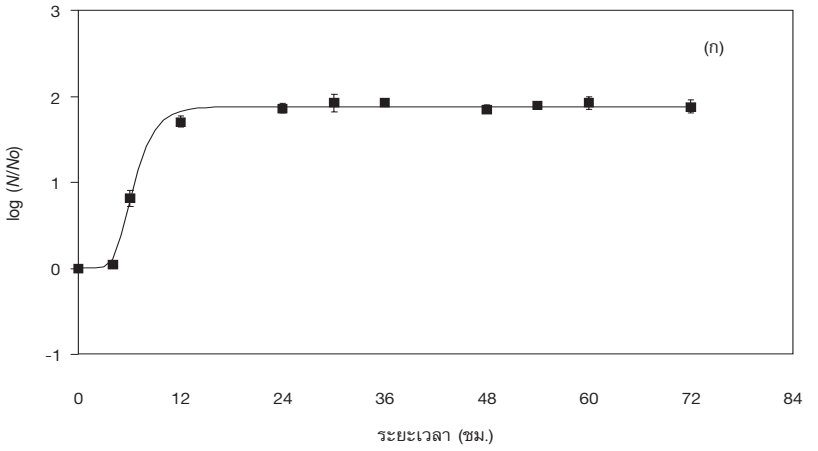
สำหรับการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน PDB ที่มี pH เท่ากับ 5.0 พบลักษณะการเจริญมีรูปร่างเป็นรูปตัว S สามารถแบ่งการเจริญเป็น 3 ช่วง เช่นเดียวกัน (รูปที่ 1(ข)) *S. cerevisie* เจริญอย่างช้าๆ เนื่องจากอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญและการแบ่งตัวของยีสต์ สังเกตได้จากระยะ Lag ที่ยาวกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย Lag time มีค่าเท่ากับ 1.77±0.19 วัน หลังจากผ่านช่วงปรับตัวแล้วยีสต์จะเจริญเข้าสู่ระยะ Log phase มีค่า μ_m เท่ากับ 1.23±0.07 (วัน$^{-1}$) โดยค่า μ_m ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) จากนั้นยีสต์จะเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase มีค่า A เท่ากับ 2.38±0.03 ซึ่งต่ำกว่าการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05)

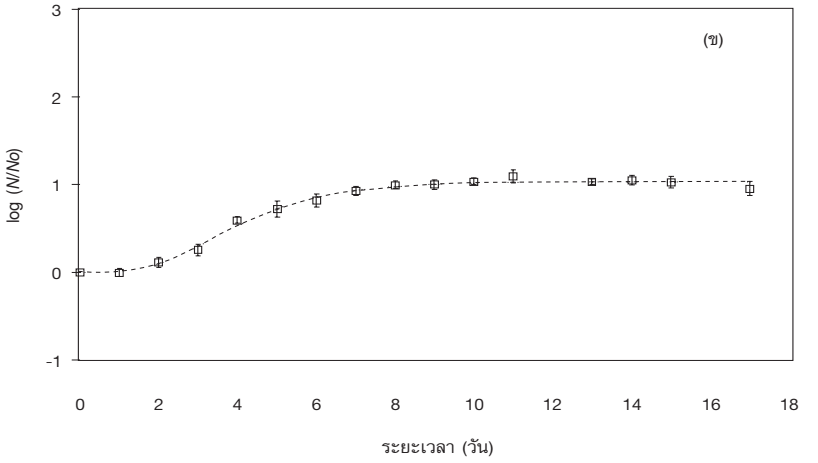
เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจาก 30 เป็น 4 องศาเซลเซียส มีผลทำให้พารามิเตอร์การเจริญเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดย λ ที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อ λ นั่นคือ Lag time จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง สำหรับความสามารถในการเจริญอย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิต่ำของจุลินทรีย์อาจเกิดเนื่องจากองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ เช่น ไขมันมีการเปลี่ยนแปลงหรือปรับตัวเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป [12] การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันดังกล่าวส่งผลให้การขนส่งโปรตีนในเซลล์ทำงานได้น้อยลงและเอนไซม์ทำงาน

ช้าลง ทำให้เซลล์เจริญได้ช้าลง นอกจากนี้ยีสต์อาจสามารถสร้างโปรตีนที่จำเพาะได้หลายชนิดอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ [13] ทำให้ยีสต์มีการปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำ สามารถเจริญได้แต่อัตราการเจริญจะลดลงและ Lag time นานขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิต่ำยังมีผลต่ออัตราการเจริญ โดยที่อัตราการเจริญจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจากอุณหภูมิที่เหมาะสมไปถึงอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิยังส่งผลต่อค่า A โดยค่า A จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจาก 30 ไป 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญแตกต่างกันซึ่งขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์นี้ถูกชะลอการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ของการเจริญของยีสต์ใน PDB pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พารามิเตอร์การเจริญ (ค่าเฉลี่ย± S.D.)		
	λ (วัน)	μ_m (วัน$^{-1}$)	A
30	0.17±0.01	7.80±0.80	4.33±0.13
4	1.77±0.19	1.23±0.07	2.38±0.03





รูปที่ 1 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร PDB
(ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ (ข) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3.2 ผลของ pH และไคโตซานต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญของ *S. cerevisiae* ใน PDB ที่ไม่เติมไคโตซานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มี pH เท่ากับ 4.5 มีการเจริญเป็นรูปตัว S ดังรูปที่ 2(ก) และแบ่งการเจริญเป็น 3 ช่วง คือ ระยะ Lag phase, Log phase และ Stationary phase สามารถหาพารามิเตอร์การเจริญได้จากสมการที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่า λ เท่ากับ 0.16±0.02 วัน (3.79±0.43 ชั่วโมง) ค่า μ_m (วัน$^{-1}$) เท่ากับ 7.54±1.19 และค่า A เท่ากับ 4.35±0.12 เมื่อปรับลด pH ของ PDB เหลือ 3.5 พบกราฟการเจริญเป็นรูปตัว S เช่นเดียวกัน (รูป 2 (ก)) แต่ระยะ Lag phase จะยาวขึ้น จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ Stationary phase ทั้งนี้ที่ pH 3.5 มีค่า λ เท่ากับ 1.72±0.10 วัน ค่า μ_m (วัน$^{-1}$) และ A เท่ากับ 4.04±0.71 และ 1.61±0.12 เมื่อเติมไคโตซานลงใน PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กราฟจะเปลี่ยนจากกราฟการเจริญเป็นกราฟการรอดชีวิต ซึ่งเขียนในรูปของ Logarithmic survival curve นั่นคือ $\log S(t)$ ซึ่งหาได้จาก log $\frac{N}{N_0}$ กับ เวลา (t) เนื่องจากกราฟการรอดชีวิตที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง สามารถใช้สมการที่ 2 ในการคำนวณเวลาที่ใช้สำหรับลดจำนวนจุลินทรีย์ลง 1 Log cycle, D

$$\log S(t) = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \qquad \textbf{(2)}$$

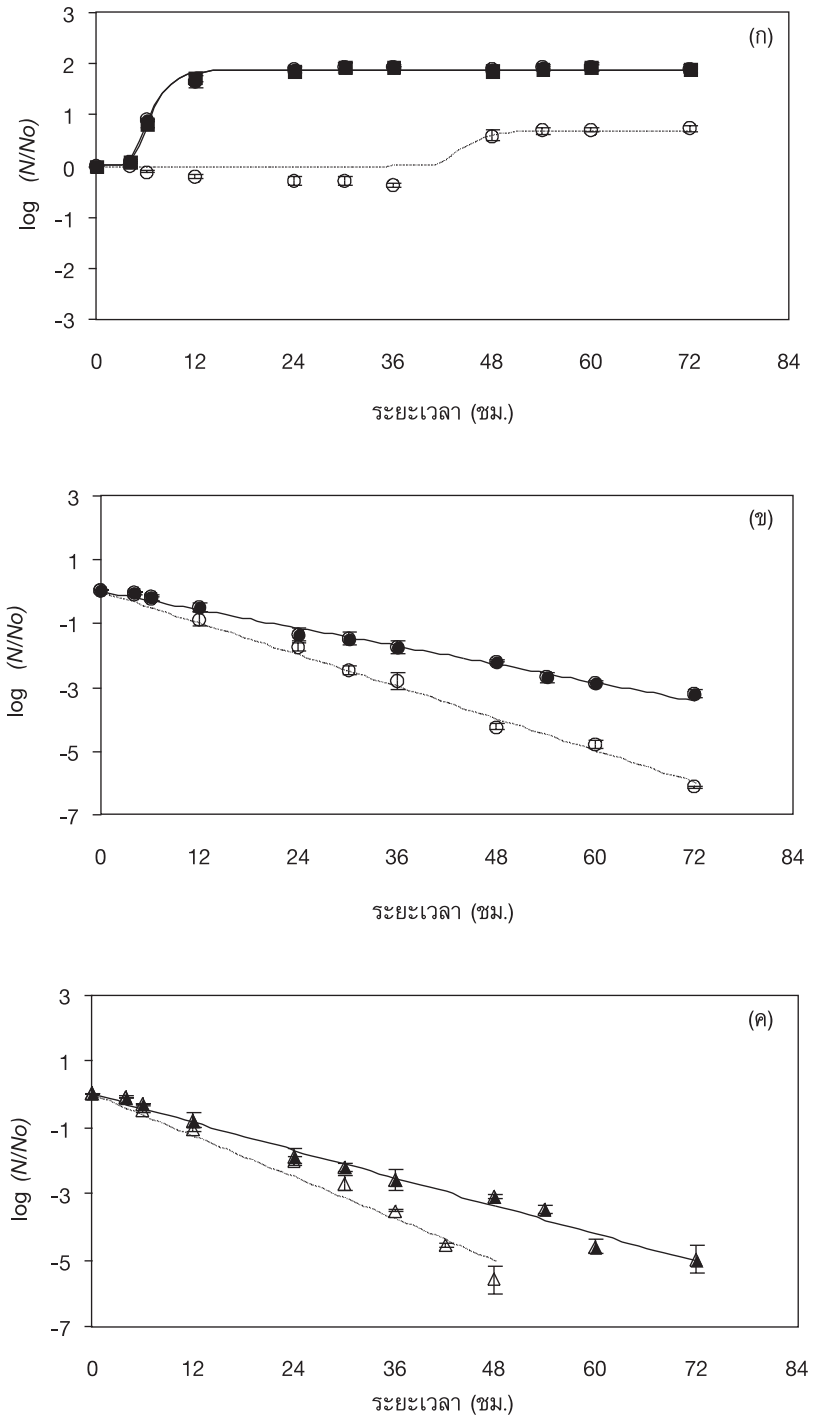
ตารางที่ 2 พารามิเตอร์การเจริญและการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* ใน PDB ที่ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นไคโตซาน (กรัม/ลิตร)	pH	พารามิเตอร์การเจริญ (ค่าเฉลี่ย±S.D.)			พารามิเตอร์การรอดชีวิต (ค่าเฉลี่ย±S.D.)
		λ (วัน)	μ_m (วัน$^{-1}$)	A	*D*-Value (วัน)
0	4.5	0.16±0.02	7.54±1.19	4.35±0.12	-
	3.5	1.72±0.10	4.04±0.71	1.61±0.12	-
1	4.5	-	-	-	0.88±0.03
	3.5	-	-	-	0.50±0.01
2	4.5	-	-	-	0.59±0.04
	3.5	-	-	-	0.40±0.02

ตารางที่ 3 การยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Log_{10} reduction) ที่ 30 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นไคโตซาน(กรัม/ลิตร)	pH	Log_{10} reduction (ค่าเฉลี่ย±S.D.)
0	4.5	-
	3.5	-
1	4.5	3.43±0.10
	3.5	5.98±0.07
2	4.5	5.07±0.30
	3.5	*

หมายเหตุ - หมายถึง กราฟการเจริญ, * หมายถึง ไม่พบการรอดชีวิต



รูปที่ 2 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 4.5 (ทึบ) และ 3.5 (โปร่ง) เมื่อ (ก) ไม่เติมไคโตซาน (ข) เติมไคโตซาน 1 กรัมต่อลิตร และ (ค) เติมไคโตซาน 2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2 แสดงค่า D ของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร PDB ที่สภาวะการทดลองต่างๆ ที่ทำนายได้จากการใช้สมการที่ 2 ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 1 กรัมต่อลิตร pH 4.5 และ 3.5 ค่า D เท่ากับ 0.88±0.03 วัน (21.03±0.60 ชั่วโมง) และ 0.50±0.01 วัน (12.03±0.13 ชั่วโมง) ตามลำดับ และ PDB ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 2 กรัมต่อลิตร pH 4.5 และ 3.5 มีค่า D เท่ากับ 0.59±0.04 วัน (14.25±0.87 ชั่วโมง) และ 0.40±0.02 วัน (9.56±0.43 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ในรูป Log_{10} reduction ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) พบว่ายีสต์ลดจำนวนลง 3.43±0.10 Log_{10} ใน PDB ที่มีไคโตซานเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่ pH 4.5 เมื่อ pH อาหารลดลงเหลือ 3.5 ยีสต์ลดจำนวนลง 5.98±0.07 Log_{10} แสดงให้เห็นว่า เมื่อ pH ลดลงยีสต์จะถูกยับยั้งเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไคโตซานเป็น 2 กรัมต่อลิตรที่ pH 4.5 ยีสต์ถูกยับยั้ง 5.07±0.30 Log_{10} ในขณะที่ pH 3.5 ยีสต์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ (ไม่พบการรอดชีวิต) ภายในเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์การเจริญของยีสต์ในอาหาร PDB ที่ pH 5.0 4.5 และ 3.5 ไม่พบความแตกต่างของค่า λ, μ_m และ A ระหว่าง pH 5.0 และ 4.5 อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) เนื่องจากกรดอะซิติกที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเป็นกรดอินทรีย์ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้เมื่อกรดมีความเข้มข้นต่ำ [14] ดังนั้นยีสต์จึงยังคงสามารถเจริญได้ตามปกติที่ pH 4.5 ทั้งนี้ *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส [13] [15] ซึ่งมี pH เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-5.0 [15] ทำให้ไม่พบความแตกต่างระหว่างพารามิเตอร์การเจริญทั้ง 3 ตัวอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้กรดอะซิติกสามารถผ่านชั้น Plasma membrane เข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์และแตกตัวเป็น H^+ (ประจุบวก) และ COO^- (ประจุลบ) ภายในเซลล์ได้ ซึ่งยีสต์มี pH ภายในประมาณ 5.8 เมื่อ pH ภายนอกไม่แตกต่างจากภายในเซลล์มากนัก เซลล์จึงยังรักษาสมดุลของ pH ภายในเซลล์ได้ โดยสามารถส่งผ่านโปรตอนและหมู่ COO^- ออกนอกเซลล์ได้ตามปกติ [16] เมื่อลด pH ลงเหลือ 3.5 การเจริญของยีสต์จะแตกต่างไปจากที่ pH 5.0 และ 4.5 โดยที่ค่า λ เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า μ_m และค่า A ลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเซลล์ส่วนหนึ่งถูกทำลายไปและเซลล์บางส่วนที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวน เนื่องจากเมื่อ pH ลดลง กรดอะซิติกในรูปที่ไม่แตกตัวจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งรูปของกรดดังกล่าวสามารถผ่านชั้นไขมันที่ผนัง Plasma membrane ของเซลล์เข้าไปภายใน Cytoplasm และแตกตัวภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการสะสมโปรตอนและหมู่ COO^- เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลง จนกระทั่งเซลล์ไม่สามารถส่งโปรตอนและหมู่ COO^- ออกนอกเซลล์ได้ ส่งผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ถูกยับยั้ง เอนไซม์และโปรตีนถูกทำลาย [17] อีกทั้งขัดขวางกระบวนการ Glycolysis [18] มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของกรดอินทรีย์ที่เซลล์ทนได้ขึ้นกับอัตราเร็วและความสามารถการส่งผ่านกรดอินทรีย์ออกนอกเซลล์ ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ [17] สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* มักถูกทำลายด้วยกรดอะซิติก [18-19]

ผลการทดลองแสดงว่าไคโตซานและ pH มีผลต่อการลดจำนวนยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) โดยที่ไคโตซานเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ได้ดีที่สุดที่ pH 3.5 ในขณะที่ไคโตซานเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร pH 3.5 และไคโตซานความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร pH 4.5 สามารถยับยั้งยีสต์ได้ดีเช่นกันโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) และลำดับสุดท้ายคือที่ความเข้มข้นของไคโตซานเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร pH 4.5 สามารถยับยั้งยีสต์ได้น้อยที่สุด ไคโตซานเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น Polycationic เมื่อ pH ของอาหารน้อยกว่าค่า pKa ของไคโตซานซึ่งเท่ากับ 6.1-6.8 [20] ส่งผลให้มีประจุบวกที่หมู่อะมิโน ($-NH_2$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 อยู่มากและประจุบวกเหล่านี้สามารถจับกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ เช่น กลูแคน แมนแนน โปรตีนและไขมัน [21-22] ซึ่งมีสมบัติเป็นประจุลบ ส่งผลรบกวนสมบัติการเลือกผ่านสารเข้าออกจากเซลล์ทำให้เซลล์ถูกทำลาย

[20] [23] นอกจากนี้ยังมีผลของกรดอะซิติก กล่าวคือที่ pH ต่ำ กรดอะซิติกจะแตกตัวได้น้อยทำให้มีส่วนที่ไม่แตกตัวมากขึ้น ซึ่งส่วนที่ไม่แตกตัวนี้สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้จึงทำให้เซลล์ถูกทำลาย ดังนั้นการใช้ไคโตซานร่วมกับ pH ต่ำหรือกรดอะซิติก หรือใช้ร่วมกันทั้งสองปัจจัย จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ดียิ่งขึ้น

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าไคโตซานมีผลช่วยยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีขึ้นทั้ง 2 ความเข้มข้น ทั้งนี้ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ พบว่ายีสต์ถูกยับยั้งได้รวดเร็ว เนื่องจากเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิเหมาะสม [25] โดยยีสต์จะนำอาหารไปใช้อย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มจำนวนและถูกยับยั้งได้รวดเร็วเช่นกัน นอกจากนี้ประสิทธิภาพการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อ pH ลดลงหรือปริมาณกรดอะซิติกสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Roller และ Covill [7] ซึ่งพบว่าผลของ Glycosan glutamate ในอาหาร Malt extract agar สามารถชะลอการเจริญของรา *Mucor racemosum* ที่ pH 4.5 ได้ดีกว่าที่ pH 5.2 นอกจากนี้ไคโตซานกลูตาเมตในน้ำผลไม้ที่ pH 3.3 สามารถยับยั้งยีสต์ทั่ว ๆ ไปได้มากกว่าใน chickpea-based dip ที่มี pH 4.2 [8]

3.3 ผลของ pH และไคโตซานต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่ 4 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน PDB ที่มี pH 4.5 พบว่ายีสต์มีการเจริญเป็นรูปตัว S ดังรูปที่ 3(ก) ที่มีการเจริญเป็น 3 ช่วง คือ Lag, Log และ Stationary phase ซึ่งสามารถหาพารามิเตอร์การเจริญได้จากสมการที่ 1 แสดงดังตารางที่ 4 คือค่า λ เท่ากับ 1.40±0.12 วัน ค่า μ_m (วัน$^{-1}$) เท่ากับ 1.24±0.19 เมื่อปรับ pH ของ PDB ลดลงเหลือ 3.5 ด้วยกรดอะซิติกกราฟจะเปลี่ยนจากกราฟการเจริญเป็นกราฟการรอดชีวิตอย่างช้าๆ โดยไม่พบการเพิ่มจำนวนหรือแนวโน้มการกลับมาเจริญได้ใหม่ในช่วงระยะเวลาของการศึกษา 72 ชั่วโมง และสามารถทำนายเวลาในการลดยีสต์ลง 1 log cycle ได้จากสมการที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 4 คือ มีค่า D เท่ากับ 31.97±3.52 วัน เมื่อเติมไคโตซานลงในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิดังกล่าว ยีสต์จะถูกทำลายหรือลดจำนวนลงอย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีไคโตซานดังรูปที่ 3 (ข) และ 3 (ค) เมื่อเขียนกราฟการรอดชีวิตของยีสต์ในรูปของ $\log S\ (t)$ กับเวลา (t) พบว่าจะได้กราฟการลดลง 2 แบบคือแบบเป็นเส้นตรงและไม่เป็นเส้นตรง โดยสามารถหาความสัมพันธ์ของกราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงได้จากสมการที่ 2 และกราฟที่มีลักษณะการลดลงเป็นรูปตัว S สามารถหาความสัมพันธ์ของกราฟได้จากสมการที่ 3 [24] เมื่อพารามิเตอร์ k_1, k_2 และ m คือค่าคงที่การรอดชีวิตสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

$$\log\ S = \frac{-t^m}{k_1 + (k_2 \times t^m)} \qquad \textbf{(3)}$$

พบว่าอาหารที่มีไคโตซานเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่ pH 4.5 มีค่า D เท่ากับ 9.96±0.98 วัน ดังตารางที่ 4 เมื่อ pH ของอาหารลดลงเท่ากับ 3.5 มีค่า D เท่ากับ 4.05±0.23 วัน สำหรับที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 2 กรัมต่อลิตรที่ pH 4.5 มีค่า D เท่ากับ 4.57±0.21 เมื่อ pH ของอาหารลดลงเท่ากับ 3.5 กราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นรูปตัว S ที่มีพารามิเตอร์การรอดชีวิตแสดงอยู่ในรูปของค่าคงที่ k_1, k_2 และ m ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.82±0.13, 2.93±0.91 และ 0.17±0.01 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับที่ 30 องศาเซลเซียส ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ในรูป Log_{10} reduction ภายในระยะเวลา 17 วัน จากยีสต์เริ่มต้นประมาณ 1.10-1.50×10^6 CFUต่อ

มิลลิลิตร (ตารางที่ 5) พบว่า PDB ที่มี pH 3.5 ยีสต์ลดจำนวนลง 0.54±0.06 Log_{10} เมื่อเติมไคโตซานลงในอาหารจะพบว่ายีสต์จะลดจำนวนลงดังนี้ PDB ที่มีไคโตซานเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร pH 4.5 ยีสต์ลดจำนวนลง 1.72±0.16 Log_{10} เมื่อ pH อาหารลดลงเหลือ 3.5 ยีสต์ลดจำนวนลง 4.21±0.24 Log_{10} แสดงให้เห็นว่า เมื่อ pH ลดลงยีสต์จะถูกทำลายมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 2 กรัมต่อลิตร ที่ pH 4.5 และ 3.5 ยีสต์ถูกยับยั้ง 3.73±0.17 Log_{10} และ 5.49±0.19 Log_{10} ภายในเวลา 17 วัน จากการคำนวณทางสถิติพบว่า pH และไคโตซานมีผลต่อการลดจำนวนยีสต์ภาย 17 วัน อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) และเมื่อใช้ปัจจัยทั้ง 2 ร่วมกันจะส่งผลให้การยับยั้งการเจริญของยีสต์ดีขึ้น

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์การเจริญและการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* ใน PDB ที่ 4 องศาเซลเซียส

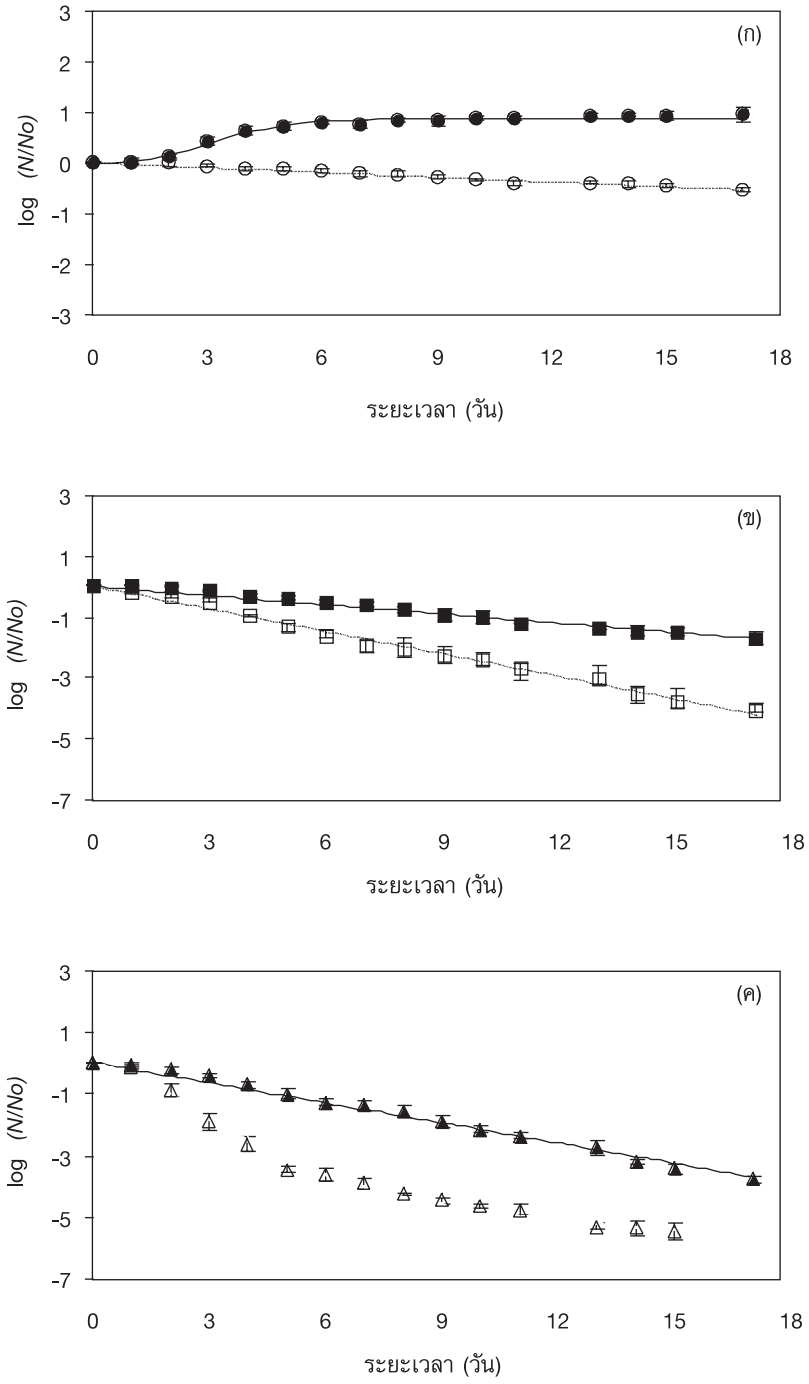
ความเข้มข้นไคโตซาน (กรัม/ลิตร)	**pH**	**พารามิเตอร์การเจริญ (ค่าเฉลี่ย±S.D.)**			**พารามิเตอร์การรอดชีวิต (ค่าเฉลี่ย±S.D.) ค่า D (วัน)**
		λ (วัน)	**μ_m (วัน$^{-1}$)**	**A**	
0	4.5	1.40±0.12	1.24±0.19	2.05±0.09	-
	3.5				31.97±3.52
1	4.5	-	-	-	9.96±0.98
	3.5	-	-	-	4.05±0.23
2	4.5	-	-	-	4.57±0.21

ความเข้มข้นไคโตซาน	pH	พารามิเตอร์การรอดชีวิต (ค่าเฉลี่ย±S.D.)		
		m	k_1	k_2
2	3.5	1.82±0.13	2.93±0.91	0.17±0.01

ตารางที่ 5 การยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Log_{10} reduction) ที่ 4 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 17 วัน

ความเข้มข้นไคโตซาน (กรัม/ลิตร)	**pH**	**Log_{10} reduction (ค่าเฉลี่ย±S.D.)**
0	4.5	-
	3.5	0.54±0.06
1	4.5	1.72±0.16
	3.5	4.21±0.24
2	4.5	3.73±0.17
	3.5	5.49±0.19

หมายเหตุ - หมายถึง กราฟการเจริญ



รูปที่ 3 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ pH 4.5 (ทึบ) และ 3.5 (โปร่ง) เมื่อ (ก) ไม่เติมไคโตซาน (ข) เติมไคโตซาน 1 กรัมต่อลิตร และ (ค) เติมไคโตตาน 2 กรัมต่อลิตร

สำหรับการเปรียบเทียบพารามิเตอร์การเจริญของยีสต์ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเติมกรดลงใน PDB ไม่พบความแตกต่างของค่า λ และ μ_m ระหว่าง pH 5.0 และ 4.5 อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) นอกจากนี้ค่า A มีค่าเท่ากับ 2.05±0.09 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่ pH 5.0 อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า A ที่ pH 4.5 ไม่แตกต่างจาก pH 5.0 อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) สาเหตุอาจเนื่องจากเมื่อยีสต์เจริญอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิ และ pH ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญส่งผลให้ยีสต์เจริญได้น้อยลง จึงทำให้ค่า A ลดลง สำหรับการลดลงของยีสต์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน PDB ที่ปรับ pH ลดลงเท่ากับ 3.5 อาจเกิดเนื่องจากอิทธิพลของ pH ที่เปลี่ยนแปลงลดลงส่งผลให้กรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น และส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายดังเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังมีผลของอุณหภูมิต่ำซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา ทำให้ยีสต์ถูกทำลายในที่สุด อย่างไรก็ตาม PDB ที่มีไคโตซานเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรที่ pH 4.5 มีประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ไม่แตกต่างจาก PDB ที่มีไคโตซานเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร pH 3.5 อย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) สำหรับไคโตซานเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร pH 3.5 กราฟการรอดชีวิตมีลักษณะคล้ายตัว S ซึ่งมีระยะ Tailing ช่วงท้ายของการศึกษา ซึ่งจะพบเซลล์บางส่วนที่มีความต้านทานต่อไคโตซานและกรดอะซิติก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่ 4 องศาเซลเซียสในอาหารที่เติมกับที่ไม่เติมไคโตซาน พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ 4 องศาเซลเซียสได้เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้ไคโตซานร่วมกับอุณหภูมิต่ำจะช่วยให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhoades และ Roller [8] ที่พบว่าไคโตซานกลูตาเมต 0.3 กรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ในน้ำแอปเปิ้ลที่ 7 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 13 วัน และไคโตซานกลูตาเมต 9 มิลลิกรัมต่อกุ้ง 1 กรัมช่วยให้เก็บน้ำสลัดกุ้งที่ 5 องศาเซลเซียสได้นาน 28 วัน [9] ในขณะที่น้ำสลัดที่ไม่เติมไคโตซานเก็บได้นาน 8 วัน ก่อนยีสต์จะเจริญเพิ่มจำนวนอีกครั้ง นอกจากนี้ Roller และ Covill [9] ยังพบว่าไคโตซานกลูตาเมต 3 กรัมต่อลิตรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus fructivorans* ในมายองเนสที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.16 ที่ 5 และ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นไคโตซานจึงมีบทบาทสำคัญต่ออาหารที่ต้องการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และสามารถนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้กับอาหารที่มีความเป็นกรดและที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุการเก็บให้ยาวนานขึ้น

4. สรุป

1. ชนิดของไคโตซานและความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง คือ 1 และ 2 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ *S. cerevisiae* และประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ pH ต่ำ

2. อุณหภูมิเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. cerevisiae* ณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *S. cerevisiae* พบว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารที่มี pH เท่ากับ 3.5 และไคโตซานเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จะถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 72 ชั่วโมงของการศึกษา สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์มีการลดจำนวนลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา (17 วัน)

3. มีความเป็นไปได้ในการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้กับอาหารที่มีความเป็นกรดสูง และอาจใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อชะลอการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากยีสต์

5. เอกสารอ้างอิง

1. Ausar, S. F., Passalacqua, N., Castagna, L. F., Bianco I. D., and Beltramo, D. M., 2002, "Growth of Milk Fermentative Bacteria in the Presence of Chitosan for Potential Use in Cheese Making," *International Dairy Journal*, Vol. 12, pp. 899-906.

2. Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., and Goosen, M. F. A., 1997, *Applications of Chitin and Chitosan*, Goosen, M.F.A. (Ed.), Technomic Publishing, New York, pp. 3-21.

3. Darmadji, P. and Izumimoto, M., 1994, "Effect of Chitosan in Meat Preservation," *Meat Science*, Vol. 38, pp. 243-254.

4. Fang, S. W., Li, C. F., and Shin, Y. C., 1994, "Antifungal Activity of Chitosan and Its Preservative Effect on Low Sugar Candied Kumquat," *Journal of Food Protection*, Vol. 56, pp. 136-140.

5. Chen, C. S., Liau, W. Y., and Tsai, G. J., 1998, "Antibacterial Effects of *N*-Sulfonated and *N*-Sulfobenzoyl Chitosan and Application to Oyster Preservation," *Journal of Food Protection*, Vol. 61, No. 9, pp. 1124-1128.

6. Tsai, G. J., Wu, Z. Y., and Su, W. H., 2000, "Antibacterial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture Prepared by Cellulase Digestion of Shrimp Chitosan and Its Application to Milk Preservation," *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 6, pp. 747-752.

7. Roller, S. and Covill, N., 1999, "The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 47, pp. 67-77.

8. Rhoades, J. and Roller, S., 2000, "Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan Against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 1, pp. 80-86.

9. Roller, S. and Covill, N., 2000, "The Antimicrobial Properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads," *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 2, pp. 202-209.

10. Sagoo, S., Board, R., and Roller, S., 2002, "Chitosan Inhibits Growth of Spoilage Microorganisms in Chilled Pork Products," *Food Microbiology*, Vol. 19, pp. 175-182.

11. Zwietering, M. H., Gongenburger, I., Rombouts, F. M., and Riet, K. V., 1990, "Modeling of the Bacterial Growth Curve," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 6, pp. 1875-1881.

12. Russell, N. J., 2002, "Bacterial Membranes: the Effects of Chill Storage and Food Processing: An Overview," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 79, pp. 27-34.

13. Homma, T., Iwahashi, H., and Komatsu, Y., 2003, "Yeast Gene Expression During Growth at Low Temperature," *Cryobiology*, Vol. 46, pp. 230-237.

14. Casal, M., Cardoso, H., and Leao, C., 1996, "Meachanisms Regulating the Transport of Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiology*, Vol. 142, pp. 1385-1390.

15. Alpbaz, M., Bursali, N., Ertunc, S., and Akay, B., 1997, "Application of a Statistical Technique to the Production of *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast)," *Biotechnology Applied Biochemistry*, Vol. 26, pp. 91-96.

16. Loureiro, V., 2000, "Spoilage Yeasts in Foods and Beverages: Characterization and Ecology for Improved Diagnosis and Control," *Food Research International*, Vol. 33, pp. 247-256.

17. Deak, T. and Beuchat, L. R., 1996, *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, New York, pp. 48-51.

18. Stratford, M. and Anslow, P. A., 1996, "Comparison of the Inhibitory Action on *Saccharomyces cerevisiae* of Weak Acid Preservatives, Uncouplers, and Medium Chain Fatty Acids," *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 142, pp. 53-58.

19. Ferreira, M. M., Loureiro-Pais, M. C., and Loureiro, V., 1997, "Weak Acid Inhibition of Fermentation by *Zygosaccharomyces bailli and Saccharomyces cereviaise*," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 36, pp. 145-153.

20. Tsai, G. J. and Su, W. H., 1999, "Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan Against *Escherichia coli*," *Journal of Food Protection*, Vol. 62, No. 3, pp. 239-243.

21. Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S., 2001, "Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram Negative Bacteria," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 71, pp. 235-244.

22. Choi, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., Oh, S. J., Choi, J. H. and Kim, C. Y., 2001, "In Vitro Antimicrobial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture Against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*," *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 18, pp. 553-557.

23. Uscanga, B. A. and Francois, J. M., 2003, "A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in Response to Growth Conditions and Mode of Cultivation," *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 37, pp. 268-274.

24. Peleg, M., 2000, "Microbial Survival Curve: the Reality of Flat Shoulders and Absolute Thermal Death Time", *Food Research International,* Vol. 33, pp. 531-538.