Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 307-310 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 307-310 (2556)

ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี

Antimicrobial Effect of Acetic Acid and Galangal Extract Against *Staphylococcus aureus* on Coriander

บุษกร ทองใบ[1]
Bussagon Thongbai[1]

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the antimicrobial efficacy of acetic acid and galangal extract against *Staphylococcus aureus* which was artificially contaminated on coriander. The corianders were washed with acetic acid (1%v/v), galangal extract (10 mg/ml) and combination of acetic acid (1%v/v) and galangal extract (10 mg/ml)). Contaminated coriander washed with sterile distilled water was used as control. The results showed that bacterial count of corianders washed with acetic acid, galangal extract and combination of acetic acid and galangal extract were reduced the bacteria at 1.26, 2.33 and 3.17 log CFU/g, respectively, ($p<0.05$). Thus, acetic acid (1%v/v) with galangal extract (10 mg/ml) was appropriate treatment to control bacterial population of coriander. The exposure time of acetic acid with galangal extract (5, 10, 20 and 30 min) for controlling *S. aureus* on coriander was determined. The reduction of *S. aureus* populations were 1.04, 1.32, 1.78 and 2.27 log CFU/g, respectively, ($p<0.05$). Therefore, the appropriate exposure time was 30 min. The antimicrobial efficacy of acetic acid with galangal extract has a potential as natural sanitizers for washing fresh vegetables to enchance food safety.

Keywords: Acetic acid, galangal extracts, coriander

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* ที่สร้างสภาพให้ปนเปื้อนผักชี โดยนำผักชีที่มี *S. aureus* ปนเปื้อนมาล้างด้วยกรดอะซิติก (1%v/v) สารสกัดข่า (10mg/ml) และกรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10 mg/ml) โดยมีผักชีที่สร้างสภาพปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม พบว่ากรดอะซิติก สารสกัดข่า และกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ได้ 1.26, 2.33 และ 3.17 log CFU/g ตามลำดับ ($p<0.05$) จากผลการทดลองนี้พบว่ากรดอะซิติก (1% v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10 mg/ml) เป็นสารที่เหมาะสมต่อการควบคุม *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี เมื่อศึกษาระยะเวลาแช่ผักชีที่เหมาะสมโดยแปรระยะเวลาแช่ 5, 10, 20 และ 30 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชีได้ 1.04, 1.32, 1.78 และ 2.27 log CFU/g ตามลำดับ ($p<0.05$) ดังนั้นระยะเวลาการแช่ผักชีด้วยกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าที่เหมาะสมคือ 30 นาที ซึ่งจากประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าทำให้เห็นถึงศักยภาพของสารนี้ที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับล้างผักสดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยอาหารแก่ผู้บริโภค

คำสำคัญ: กรดอะซิติก สารสกัดข่า ผักชี

คำนำ

ผักเป็นอาหารที่มีความจำเป็นอย่างหนึ่งสำหรับคนทั่วโลก โดยในปัจจุบันการรับประทานผักสดได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเพราะมีประโยชน์ต่อสุขภาพที่ดี แต่ความกังวลเรื่องความปลอดภัยอาหารจากการบริโภคผักสดก็สูงเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยในปี 2011 มีการระบาดของ *Escherichia coli* O104: H4 ในผักสด (มะเขือเทศ แตงกวา และผักกาด) ที่จำหน่ายในยุโรป โดยมีการระบาดไป 13 ประเทศทั่วยุโรปส่งผลให้มีชาวยุโรปติดเชื้อนี้ 3,256 รายและมีผู้เสียชีวิตถึง 32 ราย (สุขกมล, 2554) ดังนั้น วิธีการหรือสารที่สามารถลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ปนเปื้อนผักสดได้จึงมีความสำคัญมาก เพราะสามารถนำมาใช้สำหรับลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผัก เพื่อช่วยเพิ่มความปลอดภัยอาหารให้กับผู้บริโภคผักสดได้ การล้าง

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150
[1] Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150

ผักจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสด แต่การล้างผักสดด้วยน้ำประปาเพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ลดลงไม่แตกต่างจากผักที่ไม่ได้ล้าง (Ruiz-Cruz *et al*., 2007) แต่การล้างผักด้วยน้ำยาล้างผักซึ่งเป็นสารเคมี เช่น สารประกอบคลอรีนอาจมีผลทำให้ผักสดมีกลิ่นของคลอรีนตกค้างและยังกระตุ้นให้เกิดสารก่อมะเร็งที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น วิธีการล้างผักโดยใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ถูกเลือกมาใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผักสด ข่า (galangal) เป็นเครื่องเทศของไทยที่นิยมใช้แต่งกลิ่นอาหาร ดับกลิ่นคาวเนื้อสัตว์และยังมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* , *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* O157:H7 และ *Clostridium perferingens* (Voravuthikunchai *et al*., 2006; Vuddhakul *et al*., 2007) และกรดอะซิติก (Acetic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเจือปนอาหารที่ยอมรับว่าปลอดภัย (generally recognized as safe: GRAS) และยังพบว่ามีการนำกรดอะซิติกมาประยุกต์ใช้ในอาหารหลายชนิดเพื่อยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์และเชื้อรา (Karapinar and Gonul, 1992) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี (coriander) เพื่อเป็นการเพิ่มความปลอดภัยอาหารให้ผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม *S. aureus*

S. aureus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) slant จากภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงใน Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ใน TSB อีก 2 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ด้วย Spectrophotometer ได้ 0.8-0.9 (10^8 CFU/ml) จากนั้นนำมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1%(w/v) จนได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml

การเตรียมสารสกัดข่าและกรดอะซิติก

นำข่าอบแห้ง (50°C, 24 ชั่วโมง) บดให้มีขนาดเล็ก ทำการสกัดข่าด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ และละลายสารสกัดข่ากลับด้วยเอทานอล และทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง (∅ 0.22 μm) และทำการเตรียมเตรียมกรดอะซิติกความเข้มข้น 1%v/v ด้วยน้ำกลั่นและเตรียมสารสกัดข่าความเข้มข้น 10 mg/ml ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง

การสร้างสภาพการปนเปื้อนของ *S. aureus* บนผักชี

ผักชีซื้อจากตลาดสดในจังหวัดมหาสารคาม โดยคัดเลือกผักชีที่มีขนาดของใบและลำต้นใกล้เคียงกัน นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาประมาณ 5 นาทีเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออกไป และวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในเซลล์แขวนลอยของ *S. aureus* (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และวางให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาทีบนตะแกรงปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

ศึกษาสารทดสอบที่เหมาะสมของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี

นำผักชีที่ผ่านการสร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *S. aureus* แล้วมาล้างด้วยกรดอะซิติก (1%v/v) สารสกัดข่า (10 mg/ml) และกรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10 mg/ml) ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที โดยมีผักชีที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อล้างสารทดสอบที่เหลือออกจากผักชี ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *S. aureus* ที่รอดชีวิตด้วยวิธี Spread plate method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar ที่ผสมด้วย EY tellurite enrichment และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานปริมาณจุลินทรีย์เป็น log CFU/g โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD)

ศึกษาระยะเวลาแช่ผักที่เหมาะสมของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี

นำผักชีที่สร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *S. aureus* แล้วมาล้างด้วยสารทดสอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้น โดยแปรระยะเวลาแช่ผักเป็น 5, 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อล้างสารทดสอบที่เหลือออก ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *S. aureus* ที่รอดชีวิตด้วยวิธี Spread plate method บนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar ที่ผสมด้วย EY tellurite enrichment และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานปริมาณจุลินทรีย์เป็น log CFU/g โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

ผลและวิจารณ์

สารทดสอบที่เหมาะสมของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี

ผลของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชีแสดงดัง Figure 1 พบว่าการล้างผักชีด้วยกรดอะซิติก (1%v/v) และสารสกัดข่า (10mg/ml) อย่างเดียวสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนลงได้ 1.26 และ 2.33 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อใช้กรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10mg/ml) พบว่าสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ได้ดีกว่าการล้างด้วยกรดอะซิติกและสารสกัดข่าอย่างเดียว($p<0.05$) โดยลดปริมาณ *S. aureus* ได้ 3.17 log CFU/g

ดังนั้น สารทดสอบกรดอะซิติก (1%v/v)ร่วมกับ สารสกัดข่า (10mg/m) จึงเป็นสารทดสอบที่เหมาะสมในการใช้ลดปริมาณ *S. aureus* ที่ป‘

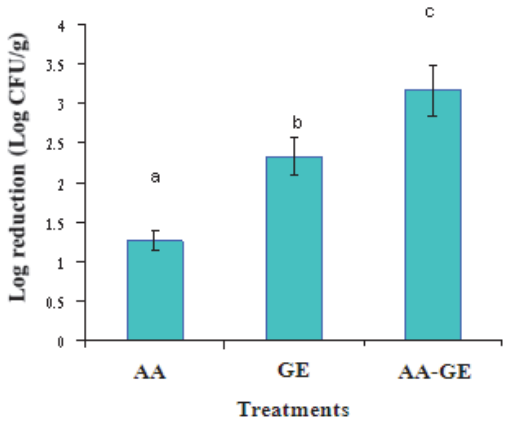

Figure 1 Effect of acetic acid (AA), galangal extract (GE) and combined acetic acid with galangal extract (AA-E) against *Staphylococcus aureus* on coriander.

[a-c]means with different letters are significantly different ($p<0.05$)

AA=Acetic acid (1%v/v), GE=Galangal extract (10 mg/ml), AA-GE= Acetic acid (1%v/v) with galangal extract (10 mg/ml)

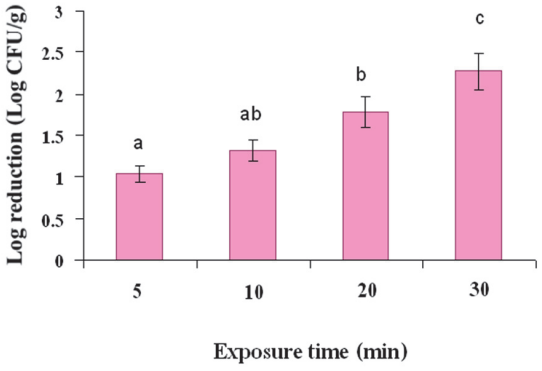

Figure 2 Exposure time of combined acetic acid (1%v/v) with galangal extract (10 mg/ml) against *Staphyococcus aureus* on coriander.

[a-c]means with different letters are significantly different ($p<0.05$)

ระยะเวลาแช่ผักที่เหมาะสมของกรดอะซิติกและสารสกัดข่าต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี

ผลการศึกษาระยะเวลาแช่ผักที่เหมาะสมของกรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10mg/ml) ที่แปรระยะเวลาแช่เป็น 5, 10, 20 และ 30 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณ *S. aureus* ได้ (p<0.05) 1.04, 1.32, 1.78 และ 2.27 log CFU/g ตามลำดับ (Figure 2) แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ผักด้วยสารผสมกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าคือ 30 นาที

จากผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติก สารสกัดข่า และสารผสมของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าต่อ *S. aureus* ที่สร้างสภาพการปนเปื้อนบนผักชีนั้น พบว่ากรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า(10 mg/ml) สามารถลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าการใช้กรดอะซิติกหรือสารสกัดข่าเพียงอย่างเดียว (p<0.05) ซึ่งเป็นผลของการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเป็นผลของกรดอะซิติกมีคุณสมบัติ lipophilic สามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้กรดอะซิติกที่ไม่แตกตัวสามารถแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์จุลินทรีย์ได้และแตกตัวภายในเซลล์มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์จุลินทรีย์ลดลงทำให้เกิดการบาดเจ็บและตายของเซลล์ (Karapinar and Gonul, 1992) และเซลล์ที่บาดเจ็บจะถูกทำให้ตายได้ง่ายขึ้นด้วยสารสกัดข่าซึ่งมี D,L-1′-acetoxychavicol acetate (ACA) เป็นองค์ประกอบหลัก โดย ACA ก็จะสามารถผ่านเข้าทางผนังเซลล์ที่บาดเจ็บไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและชั้นนอกของเซลล์แบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้นส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ภายในเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการสูญเสียสารต่างๆ ในไซโตพลาซึมไหลออกนอกเซลล์ได้ (Oonmetta-aree *et al*., 2005) จึงทำให้พบว่ามีการตายของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ในการทดลองนี้จึงพบว่าการใช้สารผสมของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *S. aureus* ได้สูงที่สุด ในขณะที่ผลการศึกษาระยะเวลาแช่ผักชีที่เหมาะสมนั้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณของ *S. aureus* ที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ใช้แช่ผักชี โดยเมื่อใช้ระยะเวลาในการแช่ผักชียิ่งนานการลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผักจะเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น ระยะเวลาการแช่ผักชีที่เหมาะสมของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่าคือ 30 นาที และจากประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกร่วมกับสารสกัดข่านี้ทำให้เห็นถึงศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นน้ำยาล้างผักชีที่เป็นสารธรรมชาติซึ่งช่วยเพิ่มความปลอดภัยอาหารในการบริโภคผักสดให้แก่ผู้บริโภคได้

สรุป

กรดอะซิติกและสารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผักชีได้ โดยการล้างผักชีด้วยกรดอะซิติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10mg/ml) เป็นเวลา 30 นาทีมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนผักชีได้มากที่สุด (p<0.05)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สุขกมล งามสม. 2554. เชื้ออี. โคไลพ่นพิษสถาบันอาหารชี้อนาคตพืชผักสดไทย ระบบตรวจสอบย้อนกลับต้องเข้มแข็ง-รวดเร็ว-แม่นยำ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.thaigov.go.th/th/news-ministry/2012-08-15-09-45-02/item/56922. (15 สิงหาคม 2555).

Karapinar, M. and S.A. Gonul. 1992. Removal of *Yersinia enterocolitica* from fresh parsley by washing with acetic acid or vinegar. International Journal Food Microbiology 16: 261 - 264.

Oonmetta-aree, J., T. Suzuki, P. Gasaluck and G. Eumke. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT. 39: 1214-1220.

Ruiz-Cruz, S., E. Acedo-Felix, M. Diaz-Cinco, M. Islas-Osuna and GA. Gonzalesz-Aguilar. 2007. Sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. Journal of Food Control 18:1383-1390.

Voravuthikunchai, S.P., S. Limsuwan, O. Supapol and S. Subhadhirasakul. 2006. Antibacterial activity of extracts from family zingiberaceae against foodborne pathogens. Journal of Food Safety 26: 325-334.

Vuddhakul, V., P. Bhoopong, F. Hayeebilan and S. Subhadhirasakul. 2007. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Food Microbiology 24: 413-418.