ผลของสารละลายไคโทซานต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.

Effect of Chitosan Solutions on Inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.

จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล[1] พนิดา บุญฤทธิ์ธงไชย[2] และ พริมา พิริยางกูร[3]

Jutatip Poubol[1], Panida Boonyaritthongchai[2] and Pharima phiriyangkul[3]

Abstract

There is an increasing demand for consumption of fresh fruit and vegetables. These may be associated with risks of foodborne disease. It have been reported that foodborne pathogen consist mostly of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. were detected in fresh fruit and vegetables. Therefore, this research investigates the effect of chitosan coating at concentrations of 0 (control), 0.5, 1.0 and 1.5% on the inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. (*in vitro* study). Cocktail suspensions of microorganisms were prepared at a concentration of 10^5 CFU/ml. Each microorganism suspensions were spread on a surface of Eosin Methylene Blue agar and Xylose Lysine Deoxycholate agar, respectively. Agars were allowed to dry. A 10 µl of chitosan coating at each concentration was added on a filter paper disc, which placed onto a surface of each agar. The petri dishes were incubated at 35±2°C for 48±3 hr. Inhibition zone of filter paper disc were measured. Chitosan coating of 0.5% was the best concentration to inhibit *Escherichia coli* and *Salmonella* sp., followed by 1.0, 1.5 and 0%, respectively. Inhibition diameter of *Escherichia coli* were 10.11, 7.41, 3.24 and 0 mm, whereas, inhibition diameter of *Salmonella* sp. were 4.75, 3.25, 2.0 and 0 mm, respectively.

Keywords: chitosan, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีความต้องการในการบริโภคผักและผลไม้สดเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม อาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบทางเดินอาหารที่มีรายงานว่าจุลินทรีย์สาเหตุโรคระบบทางเดินอาหารซึ่งตรวจพบมากในผักและผลไม้สด คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของการใช้สารละลายโคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0 (control), 0.5, 1.0 และ 1.5 ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. (*in vitro* study) โดยเตรียม cocktail suspension ของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml จากนั้นเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์โดยเกลี่ย cocktail suspension ของจุลินทรีย์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar และ Xylose Lysine Deoxycholate agar ตามลำดับ แล้ววางไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นหยดสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน filter paper disc ซึ่งวางอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง ตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดขนาดของวงใส (inhibition zone) รอบแผ่น filter paper disc ผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5 และ 0 ตามลำดับ โดยมีขนาดของ inhibition diameter ในการยับยั้ง *Escherichia coli* เท่ากับ 10.11, 7.41, 3.24 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่มีขนาดของ inhibition diameter ในการยับยั้ง *Salmonella* sp. เท่ากับ 4.75, 3.25, 2.0 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไคโทซาน, อี โคไล , ซาลโมเนลลา

[1] สาขาวิชาจุลชีววิทยา สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Division of Microbiology, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140

[2] Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, 10140

[3] สาขาวิชาชีวเคมี สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Division of Biochemistry, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

คำนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาสนใจบริโภคผักและผลไม้สดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการบริโภคผักและผลไม้สดมีประโยชน์ต่อสุขภาพ แต่อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการได้รับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานการตรวจพบมากในผักและผลไม้สดหลายชนิด (Ramos *et al*., 2013; Olaimat and Holley, 2012) ประเทศไทยเคยประสบปัญหาการส่งออกพืชผักสดไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศในปี พ.ศ. 2548 โดยเฉพาะเมื่อส่งไปจำหน่ายยังประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป โดยกรมการค้าต่างประเทศ (2550) ได้ออกประกาศในราชกิจจานุเบกษา ซึ่งกำหนดให้ผักสดที่ส่งออกไปยังจำหน่ายยังประเทศในสหภาพยุโรปนั้นเป็นสินค้าที่ต้องมีการตรวจสอบจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ดังนั้นหากผู้ประกอบการธุรกิจส่งออกผักและผลไม้สดสามารถป้องกัน กำจัด หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวได้ ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหาเบื้องต้นในด้านความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคกับผักและผลไม้สดที่จะส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศได้ ทำให้ช่วยลดปัญหาในด้านการกีดกันทางการค้าและสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค

ไคโทซาน (poly-(b-1/4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose) เป็นอนุพันธุ์ของไคทินซึ่งได้จากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเล มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Dutta *et al*., 2009) สามารถขึ้นรูปเป็นฟิลม์ (Li *et al*., 1992) ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และมีราคาถูก ดังนั้นจึงนิยมนำไคโทซานมาใช้ประโยชน์ในการแปรรูปอาหารและผลิตผลทางการเกษตร ผลงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติของไคโทซานต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น รา สาหร่าย และแบคทีเรียบางชนิด โดยพบว่าไคโทซานสามารถยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Hirano and Nagao, 1989) และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหาร (Rabea *et al*., 2003) ซึ่งสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับมวลโมเลกุล (Molecular weight; Mw) ของไคโทซานที่ใช้ โดยทั้งการเพิ่มหรือการลดมวลโมเลกุลของไคโทซานมีผลต่อการเพิ่มสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Kong *et al*., 2010) แต่มีรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ไม่ขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุลของไคโทซานที่ใช้ (Tikhonov *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความสามารถของไคโทซานที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่สภาวะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้ง เช่น สภาวะที่เป็นของเหลวหรือของแข็ง (Kong *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม หากมีการนำไคโทซานไปใช้กับผลิตผลทางการเกษตรจะนิยมใช้ในลักษณะของสารเคลือบผิว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของไคโทซานชนิด low molecular weight (LWC) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (solid state)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารละลายไคโทซานและจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้ใช้สารไคโทซานชนิด low molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich, China) โดยเตรียมสารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0 (control: กรดแอซีติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์), 0.5, 1.0 และ 1.5 ในกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับการเตรียมจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตามวิธีการของจุฑาทิพย์ และผ่องเพ็ญ (2553) โดย subculture ลงในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24$\pm$3 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์และเจือจางเซลล์จุลินทรีย์ด้วย sterile peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยเตรียม cocktail suspension ของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml แล้วเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์โดยเกลี่ย cocktail suspension ของจุลินทรีย์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue (EMB) agar สำหรับเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* และอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) สำหรับเพาะเลี้ยง *Salmonella* sp. หลังจากนั้นปล่อยให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วหยดสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน filter paper disc (Whatman No.2, England) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งวางอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48$\pm$3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความสามารถของสารละลายไคโทซานต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

2. การวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.

การศึกษาความสามารถของสารละลายไคโทซานต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ทำโดยวัดขนาดของวงใส (inhibition zone) รอบแผ่น filter paper disc ซึ่งวงใสที่วัดจะเป็นบริเวณที่จุลินทรีย์

ไม่สามารถเจริญได้ รายงานผลเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ filter paper dish ที่วัดได้ในหน่วยมิลลิเมตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized designs ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองแบบ Duncan's multiple range test

ผลและวิจารณ์

1. ผลของสารละลายไคโทซานต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.

ผลการใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. พบว่าการใช้สารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดของ inhibition diameter ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. กว้างที่สุด (Figure 1) คือเท่ากับ 10.11 และ 4.75 มิลลิเมตร (Table 1) ตามลำดับ รองลงมาคือการใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 ตามลำดับ โดยมีขนาดของ inhibition diameter ในการยับยั้ง *Escherichia coli* เท่ากับ 7.41 และ 3.24 มิลลิเมตร ในขณะที่มีขนาดของ inhibition diameter ในการยับยั้ง *Salmonella* sp. เท่ากับ 3.25 และ 2.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0% (control) ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. การที่สารละลายไคโทซานสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เนื่องจากโมเลกุลของไคโทซานมีประจุเป็นบวก ในขณะที่ cell membrane ของจุลินทรีย์มีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงทำให้ประจุบวกจับกับประจุลบที่ cell membrane และรวมตัวกันเป็นก้อน (agglutination) จึงทำให้โปรตีนและสารต่างๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการรั่วไหลทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (Seo, *et al*., 1992) เมื่อเปรียบเทียบผลของสารละลายไคโทซานต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ (Figure 1) พบว่า *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ที่มีการตอบสนอง (sensitive) ต่อสารละลายไคโทซานได้มากกว่า *Salmonella* sp. โดย *Escherichia coli* สามารถเจริญเข้าไปในบริเวณรอบแผ่นกระดาษตาปลาซึ่งมีสารละลายไคโทซานอยู่ได้น้อยกว่าการเจริญของ *Salmonella* sp. ดังนั้นจึงทำให้ขนาด inhibition diameter ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลูก *Escherichia coli* กว้างกว่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลูกเชื้อ *Salmonella* sp. ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของสารละลายไคโทซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้สด จึงควรศึกษาชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้สด

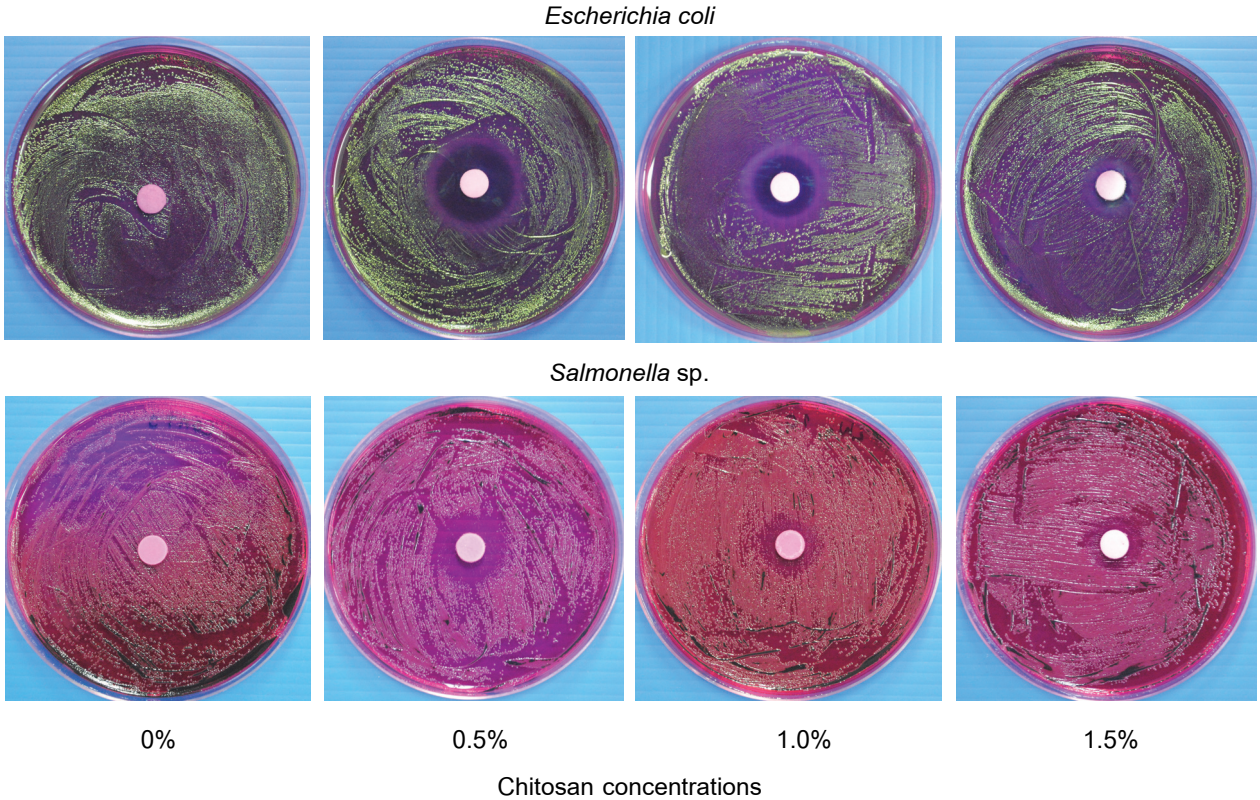

Figure 1 Inhibition zone of 0, 0.5, 1.0 and 1.5% LWC chitosan on *Escherichia coli* (up) and *Salmonella* sp. (down) growth on agar surfaces. Petri dishes were incubated at 35±2°C for 48±3 hr.

Table 1 Inhibition diameter (mm) of LWC chitosan solutions at 0, 0.5, 1.0 and 1.5% against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.

Chitosan concentrations (%)	Inhibition diameter* (mm)	
	Escherichia coli	*Salmonella* sp.
0	0	0
0.5	$10.11^{a}\pm0.31$	$4.75^{a}\pm0.23$
1.0	$7.41^{b}\pm0.09$	$3.25^{b}\pm0.08$
1.5	$3.24^{c}\pm0.17$	$2.00^{c}\pm0.10$

* Data having a same letter within each microbial species are not significantly different ($p\leq0.05$).

สรุป

การใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้สารละลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารละลายไคโทซานเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.) ประจำปีงบประมาณ 2557 และได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหน่วยวิจัยคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี (ศสวท.) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปี 2556

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2550. ประกาศกรมการค้าต่างประเทศ เรื่อง กำหนดชนิดหรือประเภทของผักและผลไม้ที่ต้องมีหนังสือรับรองในการส่งออก พ.ศ. 2550. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 55 ง. หน้า 22-24.

จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล และผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์. 2553. การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ อี.โคไลและซาลโมเนลลาในใบกะเพรา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(3/1): 401-401.

Dutta, P., S. Tripathi, G. Mehrotra and J. Dutta. 2009. Review: perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry 114: 1173-1182.

Hirano, S. and N. Nagao. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. Agricultural and Biological Chemistry 53: 3065-3066.

Kong, M., X.G. Chen, K. Xing and H.J. Park. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology 144: 51-63.

Li, Q., E.T. Dunn, E.W. Grandmaison and M.F.A. Goosen. 1992. Applications and properties of chitosan. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 7:370-397.

Olaimat, A.N. and R.A. Holley. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology 32: 1-19.

Rabea, E.I., M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Bimacromolecules 4: 1457-1465.

Ramos, B., F.A. Miller, T.R.S. Brandao, P. Teixeira and C.L.M. Silva. 2013. Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. Innovative Food Science and Emerging Technologies 20: 1-15.

Seo, H.J., K. Mitsuhashi and H. Tanibe. 1992. Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan. *In:* C.J. Brine, P.A. Sandford and J.P. Zikakis (eds.). Advances in Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science, New York. p. 34-40.

Tikhonov, V.E., E.A. Stepnova, V.G. Babak, I.A. Yamskov, J. Palma-Guerrero, H.B. Jansson, L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, D.V. Gerasimenko, I.D. Avdienko and V.P. Varlamov. 2006. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. Carbohydrate Polymers 64: 66-72.