

การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้โดยใช้ฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก  
Inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. using Chitosan-gallic Acid Films

จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล<sup>1</sup> และ พิริมา พิริยางกูร<sup>2</sup>  
Poubol, J.<sup>1</sup> and Phiriyangkul, P.<sup>2</sup>

Abstract

This research investigated an antimicrobial activity of chitosan-gallic acid film against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. found in fruits and vegetables. Chitosan solution was prepared by mixing chitosan 1%, acetic acid 1%, and glycerol 1% acting as a plasticizer together. Then gallic acid was added to chitosan solution at 0 (control), 0.5, 1.0 and 1.5%, respectively. The mixture (20 ml) was poured in a Petri dish and dried at 50°C for 72 h. A 5-mm diameter of chitosan-gallic acid films was cut and placed on the surface of Eosin Methylene Blue Agar (EMB) and Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), spread with 0.1 ml *Escherichia coli* and 0.1 ml *Salmonella* sp. suspension ( $10^5$  Log CFU/ml), respectively. The Petri dish was incubated at 35±2°C for 24±3 h. Antimicrobial activity was determined by an observed clear zone. Chitosan film incorporated with 0.5, 1.0 and 1.5% gallic acid showed antimicrobial activities against both *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. its inhibition power significantly increased with gallic acid concentration ( $p \leq 0.05$ ).

**Keywords:** chitosan film, gallic acid, microorganisms

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของฟิล์มไคโตซานผสมกรดแกลลิกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบการปนเปื้อนในผักและผลไม้ โดยได้ทดสอบกับแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 และเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไปเพื่อช่วยในการขึ้นรูปฟิล์ม นำสารละลายไคโตซานไปผสมกับกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0 และ 1.5 หลังจากนั้นเทสารละลายไคโตซานผสมกรดแกลลิกปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. โดยตัดแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหาร Eosin Methylene Blue Agar (EMB) และ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ( $10^5$  Log CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±3 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยดูจากขนาดของวงใสรอบแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก ฟิล์มไคโตซานที่ผสมกรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อความเข้มข้นของกรดแกลลิกเพิ่มสูงขึ้น

**คำสำคัญ:** ฟิล์มไคโตซาน กรดแกลลิก จุลินทรีย์

คำนำ

*Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในผักและผลไม้ และมีรายงานการนำไคโตซานซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ ไปใช้ในการเคลือบผิวผักและผลไม้หลายชนิด (จุฑาทิพย์ และพินดา, 2554; Devlieghere *et al.*, 2004; El-Ghaouth *et al.*, 1991; El Ghaouth *et al.*, 1992; Li and Yu, 2001; Romanazzi *et al.*, 2002; Poubol *et al.*, 2018) และยังใช้ในการถนอมอาหาร (No *et al.*, 2007) กรดแกลลิกจัดเป็น hydroxybenzoic acid ที่สกัดได้จากพืช มีสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรียโดยไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell

<sup>1</sup>สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>1</sup>Division of Microbiology, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

<sup>2</sup>สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2</sup>Division of Biochemistry, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

membrane) ของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* (Borges et al., 2013) และมีรายงานการใช้ประโยชน์ของไคโตซานร่วมกับกรดแกลลิกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้ medium molecular weight chitosan ความเข้มข้นร้อยละ 1 ผสมกับกรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 2.8 จากนั้นผ่านการเร่งการเกิดปฏิกิริยาของ chitosan-gallic ด้วยเอนไซม์ laccase ซึ่งพบว่าการใช้สารละลาย chitosan-gallic ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยพบว่า chitosan-gallic ไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิดการรั่วไหลของสารละลายภายในเซลล์ (cytoplasm) จึงทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสัมพัทธ์ (relative conductivity) ภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ไคโตซานยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์ (Li et al., 2019) ดังนั้นจึงสามารถนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์ร่วมกับกรดแกลลิก โดยขึ้นรูปให้เป็นแผ่นฟิล์มจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะของฟิล์มไคโตซาน-แกลลิกและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ของฟิล์มไคโตซานที่ผสมกรดแกลลิกความเข้มข้นต่าง ๆ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก

ละลายไคโตซานชนิด low molecular weight (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงในสารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อช่วยในการขึ้นรูปของฟิล์ม จากนั้นนำสารละลายไคโตซานที่ได้ไปผสมกับกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0 และ 1.5 แล้วเทสารละลายไคโตซาน-กรดแกลลิกปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปอบในตู้อบลมร้อนโดยใช้เครื่อง Universal oven (Memmert UN55, Germany) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.

### 2. การศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ของฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก

ปลูกเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงในอาหาร nutrient broth (Himedia, India) ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ  $10^5$  Log CFU/ml จากนั้นดูด cocktail suspension ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (Himedia, India) และ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (Himedia, India) ตามลำดับ แล้วใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นฟิล์มไคโตซาน-แกลลิก ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ไปวางลงผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน  $24 \pm 3$  ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยดูจากขนาดของวงใส (inhibition zone) รอบแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก ตามวิธีการของ Ponce et al. (2003) ซึ่งแบ่งขนาดของวงใสออกเป็น  $< 8$  mm (not sensitive) 9-14 mm (sensitive) 15-19 mm (very sensitive) และ  $> 20$  mm (extremely sensitive) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

## ผลและวิจารณ์

### 1. ลักษณะของฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก

ผลการทดลองพบว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมกรดแกลลิก (0% gallic acid) มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มเรียบเนียนใส (Figure 1) เมื่อเติมกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 พบว่าฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีเหลืองออกน้ำตาล โดยมีผลึกของกรดแกลลิกเกิดขึ้นบนผิวหน้าแผ่นฟิล์มเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกรดแกลลิกเป็นร้อยละ 1.5 พบว่าฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีน้ำตาล โดยมีผลึกของกรดแกลลิกเกิดขึ้นบนผิวหน้าแผ่นฟิล์มมากกว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่เติมกรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 0.5 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติมกรดแกลลิกลงในสารละลายไคโตซาน ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่เอมีนของไคโตซานกับหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดแกลลิก จึงทำให้เกิดผลึกขึ้น ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแกลลิกลงในสารละลายไคโตซานจึงส่งผลให้อัตราส่วนของหมู่คาร์บอกซิลิก สูงกว่าหมู่เอมีนเป็นเหตุให้เกิดผลึกของกรดแกลลิกบนแผ่นฟิล์มไคโตซาน-แกลลิกมากขึ้น (Sun et al., 2014) หากนำ

แผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาผักและผลไม้ภายหลังการเก็บเกี่ยว อาจจะต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงวิธีการในการขึ้นรูปฟิล์มเพื่อช่วยลดการเกิดผลึกของกรดแกลลิกบนแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก

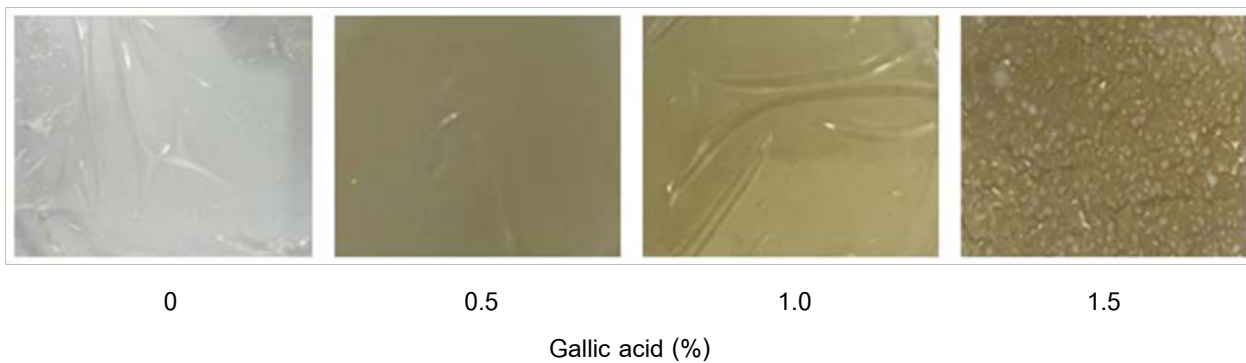


Figure 1 Appearance of chitosan-gallic acid films at various concentrations of gallic acid (0.5, 1.0 and 1.5%).

## 2. การยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ของฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิก

ผลการศึกษาความสามารถของฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. บนอาหาร Eosin Methylene Blue Agar และ Xylose Lysine Deoxycholate Agar ตามลำดับ พบว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่ได้เติมกรดแกลลิก (0% gallic acid) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ เนื่องจากไม่พบขนาดของวงใสรอบแผ่นฟิล์มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Figure 2) ในขณะที่ฟิล์มไคโตซานที่เติมกรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. โดยมีขนาดของวงใสรอบแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกเท่ากับ 9.30 และ 9.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงจัดได้ว่าทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. มีความไว (sensitive) ต่อฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ จุฑาทิพย์ และคณะ (2557) ที่ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. โดยใช้ไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 ในรูปของสารละลายที่ไม่ผสมกรดแกลลิก พบว่าการใช้ไคโตซานในรูปของสารละลายสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ โดยมีขนาดของวงใสรอบกระดาษกรองเท่ากับ 7.41 และ 3.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียวในรูปของสารละลายมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการใช้ไคโตซานในรูปของแผ่นฟิล์มที่ผสมด้วยกรดแกลลิก

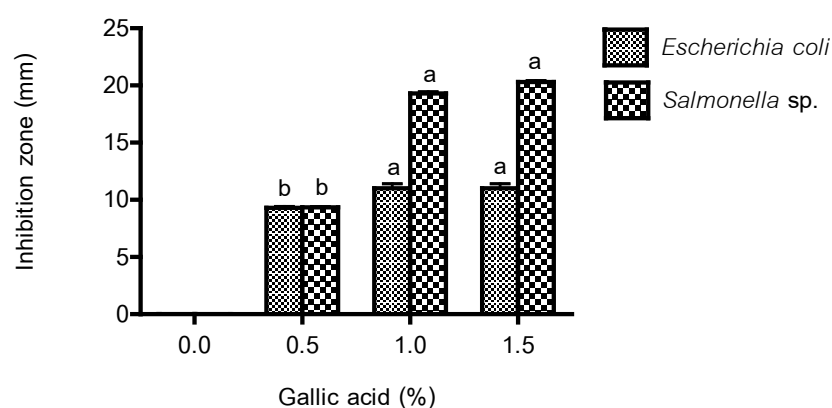


Figure 2 Diameter of inhibition zone of chitosan-gallic acid films at various concentration of gallic acid (0.5, 1.0 and 1.5%) against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. on agar plates. Different letters within the same microbial species indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแกลลิกเป็นร้อยละ 1.0 และ 1.5 พบว่าฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยโดยมีขนาดของวงใสรอบแผ่นฟิล์มเท่ากันคือเท่ากับ 11.00 มิลลิเมตร แสดง

ให้เห็นว่าเชื้อ *Escherichia coli* มีความไว (sensitive) ต่อฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 เช่นเดียวกัน (Figure 2) ในขณะที่ฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. ได้มากกว่าฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมีขนาดวงใสรอบแผ่นฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกสูงกว่าคือเท่ากับ 19.30 และ 20.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Salmonella* sp. มีความไวต่อฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกในระดับที่มาก-มากที่สุด (very sensitive – extremely sensitive) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Li *et al.* (2019) ที่ใช้สารละลายผสมของไคโตซาน-กรดแกลลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งผ่านการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ laccase มีสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยมีขนาดวงใสรอบกระดาษกรองอยู่ในช่วง 11-12 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่า *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* มีความไวต่อไคโตซาน-กรดแกลลิกเช่นเดียวกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ซึ่งศึกษากับเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.

### สรุปผล

การใช้ฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกที่ทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ได้ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณกรดแกลลิกที่สูงขึ้น เชื้อ *Salmonella* sp. มีความไวต่อฟิล์มไคโตซาน-กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 มากกว่าเชื้อ *Escherichia coli*

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559 ขอขอบคุณหน่วยวิจัยคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### เอกสารอ้างอิง

- จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล และพนิดา บุญฤทธิ์ธงไชย. 2554. สารเคลือบผิวไคโตซานต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและคุณภาพของหน่อไม้ฝรั่ง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42 (2 พิเศษ) : 569-572.
- จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล, พนิดา บุญฤทธิ์ธงไชย และพริมา พิริยางกูร. 2557. ผลของสารละลายไคโตซานต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp.. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 45 (3/1 พิเศษ) : 69-72.
- Borges, A., C. Ferreira, M.J. Saavedra and M. Simoes. 2013. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance* 19 : 256-265.
- Devlieghere, F., A. Vermeulen and J. Debevere. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21 : 703-714.
- El Ghaouth, A., J. Arul, J. Grenier and A. Asselin. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Journal of Phytopathology* 82 : 398-402.
- El Ghaouth, A., J. Arul, R. Ponnampalam and M. Boulet. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56 : 1618-1620.
- Li, H. and T. Yu. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 : 269-274.
- Li, K., G. Guan, J. Zhu, H. Wu and Q. Sun. 2019. Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan-gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 96 : 234-243.
- No, H.K., S.P. Meyers, W. Prinyawiwatkul and Z. Xu. 2007. Applications of chitosan for Improvement of quality and shelf life of foods: A Review. *Journal of Food Science* 72 : R87-R100.
- Ponce, A.G., R. Fritz, C. del Valle and S.I. Roura. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Food Science and Technology* 36 : 679-684.
- Poubol, J., P. Phiriyangkul and P. Boonyaritthongchai. 2018. Antimicrobial activity of chitosan coating on asparagus spears against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.. *Acto Horticulturae* 1213 : 511-516.
- Romanazzi, G., F. Nigro, A. Ippolito, D. Di Venere and M. Salerno. 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67 : 1862-1867.
- Sun, X., Z. Wang, H. Kadouh and K. Zhou. 2014. The antimicrobial, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT-Food Science and Technology* 57 : 83-89.