Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 184-187 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 184-187 (2551)

ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฝรั่งและกรดแลคติกต่อการยับยั้งซาลโมเนลลาบนผลมะเขือเทศ

Efficacy of guava leaf extract and lactic acid against *Salmonella* on tomato

ลักขณา บรรณสาร[1] และ บุษกร ทองใบ[1]

Lakkhana Bannasan[1] and Bussagon Thongbai[1]

Abstract

The purpose of this study was evaluated the antimicrobial activity of guava leaf extract (10 mg/ml) incorporated with lactic acid (0.2, 0.4, 0.8 and 1% (v/v)), respectively to reduce *Salmonella typhimurium* on tomatoes. All treatments demonstrated inhibitory activity against *Sal. typhimurium* on tomatoes. However, the most efficient among treatments was the combination of guava leaf extract 10 mg/ml and lactic acid 1% (v/v), which decreased bacterial population by <1 logCFU/tomato ($p<0.05$). In addition, determination of appropriate exposure time at 0, 15, 30, 45 and 60 min for reducing the pathogen on tomatoes. It was found that exposure time at 60 min gave the most inhibitory activity ($p<0.05$). Therefore, a synergistic activity of guava leaf extract and lactic acid has a good potential as a natural sanitizing agent for washing fresh fruits and vegetables to enhance both food safety and quality.

Keyword: Guava leaf extract, lactic acid, *Salmonella*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดใบฝรั่ง (10 mg/ml) ร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8 และ 1% (v/v) ตามลำดับ เพื่อลดปริมาณ *Salmonella typhimurium* บนผลมะเขือเทศ พบว่าสารทดสอบทั้งหมดสามารถยับยั้ง *Sal. typhimurium* บนผลมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 1%(v/v) มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียได้มากที่สุดโดยเหลือเพียง <1 logCFU/tomato ($p<0.05$) นอกจากนี้การศึกษาระยะเวลาแช่มะเขือเทศที่เหมาะสม ซึ่งแปรระยะเวลาเป็น 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคบนมะเขือเทศนั้น พบว่าเวลาในการแช่ 60 นาที ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ($p<0.05$) ดังนั้นจากประสิทธิภาพที่เสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดใบฝรั่งและกรดแลคติกในการยับยั้ง *Sal. typhimurium* บนผลมะเขือเทศนี้ จึงน่านำสารเหล่านี้มาใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อจากสารธรรมชาติ สำหรับใช้ล้างผักผลไม้สดเพื่อช่วยเพิ่มทั้งความปลอดภัยและคุณภาพให้กับอาหาร

คำสำคัญ: สารสกัดใบฝรั่ง กรดแลคติก *Salmonella*

คำนำ

มะเขือเทศเป็นพืชผักเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยและเป็นพืชที่นิยมบริโภคแพร่หลายไปทั่วโลก มะเขือเทศเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ) ประเทศไทยส่งมะเขือเทศไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศทั้งในรูปของผลสดและการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำมะเขือเทศ ซุปมะเขือเทศ ซอสมะเขือเทศ เป็นต้น มูลค่านับพันล้านบาทต่อปี (ประสิทธิ์, 2544) โดยทั่วไปผักและผลไม้สดที่ผ่านหรือไม่ผ่านการแปรรูปขั้นต่ำ (minimal processing) มักพบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่างๆ จากน้ำและดินจากแปลงปลูก มีรายงานจากสำนักงานควบคุมและป้องกันโรคประเทศสหรัฐอเมริกา (CDC, 2006) พบการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* ที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศสดซึ่งถูกนำไปประกอบอาหารในภัตตาคารมากกว่า 21 รัฐ พบมีผู้ป่วยถึง 183 ราย และเมื่อเดือนมิถุนายน 2008 US Food and Drug Administration (FDA) ได้รายงานพบผู้ป่วย 145-150 ราย จาก 16 รัฐทั่วสหรัฐอเมริกา เนื่องจากรับประทานมะเขือเทศที่ปนเปื้อน *Salmonella* SaintPaul ซึ่งการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนผักและผลไม้สดนิยมใช้วิธีการล้างผักและผลไม้ด้วยน้ำยาล้างผักซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเคมี เช่นสารประกอบคลอรีน แต่อาจส่งผลให้ผักและผลไม้

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44000

[1] Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham

มีกลิ่นของคลอรีนตกค้างหรืออาจกระตุ้นให้เกิดสารก่อมะเร็งซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Ames, 1979) ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่ใช้สารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารเพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิ-

ภาพของสารสกัดใบฝรั่งซึ่งมีสารแทนนินและเคอซิตินเป็นส่วนประกอบ ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ได้โดยใช้ร่วมกับกรดแลคติกเพื่อลดปริมาณ *Sal. typhimurium* บนผลมะเขือเทศ เพื่อเป็นทางเลือกในการใช้สารจากธรรมชาติช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและเพิ่มความปลอดภัยอาหารในการบริโภคผักสดของผู้บริโภคได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การปนเปื้อนของ Sal. typhimurium

นำผลมะเขือเทศ (ทั้งผล) มาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก สะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใน biological safety cabinet (จิตศิริ, 2543) เติมสารแขวนลอยของ Sal. typhimurium (cell suspention) ปริมาตร 1 ml (10^9 CFU/ml) ด้วยวิธี sprinkle (Singh, 2002) วางบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อใน biological safety cabinet ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Kim, 2006)

2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบฝรั่งและกรดแลคติกต่อการลดปริมาณ Sal. typhimurium ที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศ

นำสารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 0.2, 0.4, 0.8 และ 1% (v/v) และน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม มาทดสอบด้วยการล้างผลมะเขือเทศที่เติม Sal. typhimurium แล้วแบ่งเป็น 5 ชุดใส่ลงในถุงโพลีเอทิลีนแบบปิดผนึกสำเร็จรูป

ตรวจหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ Sal. typhimurium ที่เกาะติดบนผลมะเขือเทศและล้างด้วยสารทดสอบข้างต้น โดยเทสารทดสอบท่วมผลมะเขือเทศ เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (20 วินาที) สะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงใน biological safety cabinet

3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศ

นำสารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 1% (v/v) มาทดสอบเพื่อหาระยะเวลาแช่ที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณ Sal. typhimurium ที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศ (ข้อ 1) โดยแปรระยะเวลาในการแช่เป็น 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที และล้างสารออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปสะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงปลอดเชื้อใน biological safety cabinet ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง swab ผลมะเขือเทศทั้งผลและถ่ายลงใน 0.1% peptone water และทำ serial dilution เพื่อตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยวิธี viable count บน Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar บ่มที่ 37 ^{o}C 18-24 ชั่วโมงและรายงานจำนวนแบคทีเรียเป็น log CFU/tomato

ผล

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารทดสอบต่อการลดปริมาณ *Sal. typhimurium* บนผลมะเขือเทศโดยใช้ชุดทดสอบคือ สารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 0.2, 0.4, 0.8 และ 1%(v/v) และมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม ล้างผลมะเขือเทศที่เติมเชื้อ *Sal. typhimurium* พบว่าเมื่อใช้สารสกัดใบฝรั่งร่วมกับกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลให้ประสิทธิภาพในการลดแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 1) โดยเฉพาะสารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *Sal. typhimurium* ได้มากที่สุดโดยลดปริมาณแบคทีเรียจนเหลือ <1 log CFU/tomato ($p<0.05$)

Table 1 Viable count of *Sal. typhimurium* treated with guava leaf extract (10 mg/ml) and lactic acid

Treatment	Population (log CFU/tomato)	
	Viable count	Reduction
Control	5.84±0.08[d]	
GE +LA 0.2% (v/v)	4.08±0.46[c]	1.76±0.51[b]
GE +LA 0.4% (v/v)	1.76±0.24[b]	4.08±0.32[a]
GE +LA 0.8% (v/v)	1.31±0.54[ab]	4.53±0.61[a]
GE +LA 1% (v/v)	<1.00±0.77[a]	⩾4.84±0.76[a]

GE=Guava leaf extract (10 mg/ml), LA= Lactic acid (v/v), control = steriled distill water

Population before treatment was 6.86 log CFU/tomato

Reduction in population after treatment compared with the population of control

[a,b,c...]means in the column followed by different letters are significantly different at $p<0.05$

ผลของระยะเวลาการแช่ที่เหมาะสมในการลดปริมาณ *Sal. typhimurium* ที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศ เมื่อแปรระยะเวลาแช่ 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ระยะเวลา 15 นาที คือ 2.75 log CFU/tomato ในขณะที่ 15 และ 45 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้จนเหลือ <1 log CFU/tomato ($p<0.05$) และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียเมื่อแช่เป็นระยะเวลา 60 นาที

Table 2 Viable count of *Sal. typhimurium* treated with guava leaf extract (10 mg/ml) and lactic acid (1% v/v) various exposure time

Exposure time	Population (log CFU/tomato)	
(min)	Viable count	Reduction
0	2.87±0.18[b]	
15	2.75±0.15[b]	0.12±0.08[b]
30	<1.00±0.59[a]	⩾1.87±0.77[a]
45	<1.00±0.75[a]	⩾1.87±0.61[a]
60	ND[a]	2.87±1.18[a]

Population before treatment was 5.03 log CFU/tomato

[a,b,c...]means in the column followed by different letters are significantly different at $p<0.05$

วิจารณ์ผล

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับกรดแลคติกต่อการลดปริมาณ *Sal. typhimurium* ที่ปนเปื้อนบนผลมะเขือเทศ พบว่าสารสกัดใบฝรั่ง 10 mg/ml ร่วมกับกรดแลคติก 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Sal. typhimurium* ได้มากที่สุดสามารถลดปริมาณแบคทีเรียเหลือ <1 log CFU/tomato ($p<0.05$) โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษาของมนต์จันทร์ (2548) พบว่าการแช่ผักกาดหอมในสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติก 10%(v/v) นาน 15 นาที สามารถลด *Salmonella* ได้ 1.2 log CFU/g และแครอทหั่นฝอย 5%(v/v) นาน 15 นาที สามารถลด *Salmonella* ได้ 1.4 log CFU/g และ Yuk *et al.* (2007) รายงานผลของกรดแลคติก 1% สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes* บนเห็ด enoki เมื่อแช่นาน 5 นาที ได้ 1.19 และ 0.71 log CFU/g ตามลำดับ เนื่องจากกรดแลคติกจะไปมีผลต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์แบคทีเรียเกิดการบาดเจ็บของเซลล์และตายในที่สุด และสารสกัดใบฝรั่งซึ่งมีประกอบ flavonoids (tannin และ quercetin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยมีผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ของแบคทีเรีย (Rattanachaikunsopon, 2007, อรัญญาและจีรเดช, 2548) ดังนั้นเมื่อใช้สารสกัดใบฝรั่งร่วมกับกรดแลคติกจึงให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กัน เนื่องจากเซลล์ของ *Sal. typhimurium* ที่บาดเจ็บจะมีการซึมผ่านของสารสกัดใบฝรั่งเข้าไปทำ

อันตรายเซลล์ได้มากยิ่งขึ้นและสภาวะที่กรดแลคติกเข้มข้นสูงขึ้น (1%) จึงพบการรอดชีวิตของ *Sal. typhimurium* ต่ำหรือไม่พบเลย นอกจากนี้ระยะเวลาแช่ก็มีผลต่อประสิทธิภาพการลดปริมาณแบคทีเรีย โดยระยะเวลาที่สารทดสอบสัมผัสกับแบคทีเรีย (contact time) นานขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียได้มากขึ้น (ธีรพร, 2546) จากผลการทดลองนี้พบว่าระยะเวลาแช่ที่เหมาะสมคือ 60 นาที ($p<0.05$) เพราะไม่พบการรอดชีวิตของ *Sal. typhimurium* เลย ผลการศึกษานี้จึงน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำสารสกัดใบฝรั่งและกรดแลคติกมาใช้ร่วมกัน เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในอาหารจากสารธรรมชาติ (natural food preservative) ซึ่งเพิ่มความปลอดภัยอาหารให้ผู้บริโภค

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัยและกองส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยมหาสารคามสำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของนิสิตระดับปริญญาโทงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2551

เอกสารอ้างอิง

จิตศิริ ทองสอน. 2543. ประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีนร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลด *Salmonella* Typhimurium ในผักสด. วิทยานิพนธ์ ว.ท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 101 น.

ธีรพร กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. พิษณุโลก : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. 198 น.

ประสิทธิ์ ชุติชูเดช. 2544. เทคโนโลยีการผลิตผัก. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 288 น.

มนต์จันทร์ คำยา.2548. การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแล็กทิกเพื่อลดปริมาณ *Salmonella* Typhimurium บนผัก. วิทยานิพนธ์ ว.ท.ม. กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.106 น.

สุภาภรณ์ คำแก่นคูณใจ. 2538. การยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวโดยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 222-231.

อรัญญา มโนสร้อยและจีรเดช มโนสร้อย. 2548. น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทย : การใช้ทางยาและเครื่องสำอาง. เชียงใหม่ : โรงพิมพ์ครองช่าง. 327 น.

Ames, B.N. 1979 “Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer,” p. 111. Cited by C.I. Wei, D.L. Wei, D.L. Cook and J.R. Kirk. Use of chlorine compounds in the food industry. Food Technol. 39 (1):107-115.

Kim, H., Ryu, J-H. and B, L.R. 2006. Survival of Enterobacter sakazakii on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. International Journal of Food Microbiology. 111: 134-143.

Rattanachaikunsopon, P.and Phumkhachorn, P. 2007. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fishpathogens, FITOTERAPIA.;78:434-436.

Singh, N., *et al*. 2002. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli 0157:H7* on lettuce. Food Microbiology. 19: 183-193.

Yuk, H.G., *et al*. 2007. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. Food Control. 18 : 548–553.