การใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกลดปริมาณ *Salmonella typhimurium* ในผักพร้อมบริโภค

The use of Crude Extracts from Lactic Acid Bacteria to Reduce *Salmonella typhimurium* on Ready-to-eat Produce

มนต์จันทร์ คำยา [1] **และวราภา มหากาญจนกุล**[1]

Monchan Khamya[1] and Warapa Mahakarnchanakul[1]

Abstract

The use of natural extracts may replace chemical sanitizers in washing fresh produce in order to enhance the microbiological safety in food. The study of antimicrobial efficacy of crude extracts from 7 strains of lactic acid bacteria to eliminate *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 was conducted. The tested strains were *Lactobacillus reuteri* KUB-AC 5, KUB-AC 16, KUB-AC 20, *Lactobacillus salivariu*s KUB-AC 21, *Pediococcus acidilactici* KUB-L00026, KUB-FU 4-3 and *Lactobacillus* sp. KUB-FU 1-4. All strains cultivated in MRS broth for 24 h resulting in the best antimicrobial activity, besides, at concentration of 70 % and 50 % crude extracts reduced Salmonellae cells 4-5 log within 4-8 h and 4-24 h, respectively. Among crude extracts from 7 strains, the KUB-AC 20 showed the best antimicrobial efficacy in killing Salmonellae, thus the concentration of each extract at 5, 10, 20 and 40% (v/v) was use to soak the contaminated lettuce and shredded carrot (initial load 5.6 log CFU/g). At concentration of 10% soaking for 15 min reduced *Salmonella* in lettuce by 1.2 log and at concentration of 5% soaking for 15 min reduced cells in shredded carrot by 1.4 log, without any appearance changes. However survivors could grow on lettuce at 4°C during 20 days of storage, whilst the *salmonella* cells slightly reduced in shredded carrot during stored 12 days and found non- detectable number by conventional method at the end of storage. But injured cells were recovered by enrichment technique. Results concluded that combination of crude extract from lactic acid bacteria with low temperature could reduce and delay the growth of foodborne pathogens in ready-to-eat produce.

Key words: crude extract from lactic acid bacteria, *Salmonella*, ready-to-eat produce

บทคัดย่อ

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งแทนการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อล้างผักสด เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของจุลินทรีย์ในอาหาร จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของแบคทีเรียกรดแลคติก 7 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC 5, KUB-AC 16,KUB-AC 20, *Lactobacillus salivariu*s KUB-AC 21, *Pediococcus acidilactici* KUB-L00026, KUB-FU 4-3 and *Lactobacillus* sp. KUB-FU 1-4. ในการทำลาย *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 พบว่า สารสกัดหยาบจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นเวลา 24 ช.ม.ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายซัลโมเนลลา ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 70% และ 50 % ลดซัลโมเนลลาได้ 4-5 log ภายในเวลา 4-8 ช.ม.และ4-24 ชม. ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 20 ,10 ,5 และ40 % (V/V) ในการแช่ผักปนเปื้อนซัลโมเนลลาจำนวน 5.6 log CFU/g พบว่าการแช่ผักกาดหอมในสารสกัดหยาบ 10% 15 นาทีลดซัลโมเนลลาได้ 1.2 log ในขณะที่ความเข้มข้น 5% 15นาทีลดซัลโมเนลลาในแครอทหั่นฝอยได้ 1.4 log โดยไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของผักทั้งสอง อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่รอดชีวิตในผักกาดหอมเจริญได้ขณะที่เก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 20 วัน ส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตในแครอทหั่นฝอยลดลงและตรวจไม่พบใน 12 วัน แต่สามารถตรวจพบเซลล์บาดเจ็บได้เมื่อเพาะเชื้อด้วยวิธี enrichment อาจกล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากกรดแลคติกควรใช้ควบคู่กับอุณหภูมิต่ำ จะช่วยลดและชะลอการเจริญของเชื้อโรคจากอาหารเป็นพาหะในผักพร้อมบริโภคได้

คำสำคัญ สารสกัดหยาบจากแลคติดแอซิคแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา ผักพร้อมบริโภค

คำนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาสนใจและต้องการอาหารที่เป็นธรรมชาติ ผ่านขั้นตอนการแปรรูปน้อย รวมทั้งใช้สารเคมีและวัตถุกันเสียในอาหารน้อยที่สุด ผักผลไม้สดจึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันในสหรัฐอเมริกามีรายงานโรคระบาดจากผักผลไม้สดเป็นพาหะเพิ่มมากเป็น 2 เท่า สาเหตุเกิดจากจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคหลายชนิด รวมทั้ง *Salmonella spp.* (Tauxe *et al.*,1997) จึงได้มีการรณรงค์เรื่องความปลอดภัยของอาหารประเภทนี้ รวมทั้งเข้มงวดการปฏิบัติในระหว่างการ

---

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน10900

[1]Department of Food science and Technology, Agro-Industry Faculty, Kasetsart University, Bangkaen Campus 10900

ผลิตให้ถูกสุขลักษณะเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อโรค มีการแนะนำการใช้สารฆ่าเชื้อหลายชนิดในขั้นตอนการล้างเพื่อลดและทำลายจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา สารเคมีที่นิยมใช้ยังเป็นกลุ่มของคลอรีน นอกจากนั้นยังได้แก่สารออกซิไดซิ่งเอเจนท์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) แต่ผู้ใช้ยังกังวลปัญหาบางประการได้แก่ ความสะดวกในการใช้ ราคาและประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อนั้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นสารธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดไม่ก่อโรค เพื่อยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ *Salmonella spp.* เป็นตัวแทนในการศึกษา ศึกษาความเข้มข้นและเวลาของสารสกัดหยาบที่เหมาะสมในการแช่ผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอย และศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของ *Salmonella* ในผักที่ผ่านการล้างนั้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อเป็นทางเลือกทดแทนสารเคมีฆ่าเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองและทดสอบประสิทธิภาพในการทำลาย *Salmonella*</u>

เชื้อบริสุทธิ์ *S.* Typhimurium ATCC13311 จาก (MIRCEN, กรุงเทพ) และแบคทีเรียแลคติก 7 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC 5, KUB-AC16, KUB-AC 20, *Lactobacillus salivariu*s KUB-AC 21, *Pediococcus acidilactici* KUB-L00026, KUB-FU4-3 และ *Lactobacillus* sp. KUB-FU1-4. (จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์)

เชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium เพาะเชื้อและถ่ายเชื้อในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) และตรวจนับจำนวนด้วยอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเฉพาะ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) เพาะเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก เพาะเชื้อและถ่ายเชื้อในอาหาร MRS Broth เพาะเชื้อที่ 37 °C ยกเว้นสายพันธุ์ KUB-FU4-3 และ KUB-FU1-4 เพาะเชื้อที่ 45°C ตรวจนับจำนวนโดยเพาะเชื้อด้วยอาหาร MRS Agar 24 ชั่วโมง

การสกัดสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติก เตรียมโดยวิธีการของ อรวรรณ (2546) สารสกัดหยาบที่ได้จากการเพาะเชื้อที่เวลา 16 ,8 และ 24 ชั่วโมง จะนำมาทดสอบการยับยั้งและทำลาย *S.* Typhimurium (10^5-10^4CFU/ml) ในสัดส่วนสกัดหยาบรวมกับสารละลายเชื้อ 2 :1 (v/v) ที่ 4 ,2 ,0 และ 6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยอาหาร TSA

<u>การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการลดจำนวน *S.* Typhimurium</u>

เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ KUB-AC20และ KUB-AC21 เพื่อรวมกับสารละลายเชื้อ (10^4-10^5) CFU/ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 30, 50 และ 70% (v/v) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

<u>การศึกษาผลของการสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการลด *S.* Typhimurium บนผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอย</u>

ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* Linn.) และแครอท (*Dancus carota* Linn. Sativa Thel) ซื้อจากตลาดสด ล้างและเตรียมใบผักกาดหอมให้มีขนาดใกล้เคียงกันและน้ำหนัก 12-8 กรัมต่อใบ ล้างและหั่นฝอยแครอทโดยเครื่องหั่นไฟฟ้าให้ได้ความหนาเฉลี่ย 0.5 เซนติเมตร ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติในผักทั้งสองก่อนสร้างการปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium นำมาแช่ในสารสกัดหยาบความเข้มข้น 5,10,20 และ40 % (v/v) และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) สัดส่วนผักต่อสารสกัดหยาบ 1:20 แช่เป็นเวลา 15 และ 30 นาที นำไปสะเด็ดน้ำบนตะแกรงปลอดเชื้อ ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *S.* Typhimurium ที่รอดชีวิต ผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอยที่ผ่านการล้างด้วยสารสกัดหยาบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมบรรจุในถุงโพลีเอทธิลีนแบบปิดผนึกสำเร็จรูป (ถุงซิป) ขนาด 9 x12 นิ้ว เจาะรูขนาด 0.5 มิลลิเมตร 8 รู เก็บรักษาที่ 4 °C สุ่มตัวอย่างในระหว่างการเก็บรักษาตลอดระยะเวลา 20 วัน ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์

<u>1. ปัจจัยของความเข้มข้นและเวลาของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการลดจำนวน *Salmonella*</u>

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่ผลิตเมื่ออายุ 24 ชม. สามารถทำลาย *Salmonella* ได้ดีที่สุด ทำลายเซลล์ได้หมด 4-5 log CFU/g ในเวลา 6 ชม. อรวรรณ (2546) พบว่าสารละลายใสปราศจากเซลล์ของ KUB-L00026 , KUB-FU4-3 และ KUB-FU1-4 ที่เวลา 24 ชม. จะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 6 และ 12 ชม. ปริมาณกรดที่วัดได้มีค่าตั้งแต่ 101-203 มิลลิโมลาร์ สารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง แบคทีเรียจากสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ได้แก่ กรดแลคติก นอกจากนั้นได้แก่ เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก (Nitisiprasert *et al.*, 2000) และคาดว่ามีแบคเทอรีโอซิน (bacteriocin) ร่วมด้วย จึงมีผลในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย คือ *Salmonella*

ค่าพีเอชที่วัดได้ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเชื้อ 24 ชม. มีค่า 3.7 -3.9

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติก 7 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ KUB-AC 21, AC 20, KUB-AC 16 และ KUB-FU4-3 มีประสิทธิภาพในการทำลาย *Salmonella* ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 30, 50 และ 70% (v/v) ในเวลา 4-8 ชม. (Fig. 1) รองลงมาได้แก่ KUB-AC 5, KUB-FU1-4 และ KUB–L00026 (Fig 1) จึงได้เลือกใช้สารสกัดหยาบจาก KUB-AC 20 และ KUB-AC 21 เพื่อทดสอบการลดแบคทีเรียก่อโรคในผักสดปนเปื้อนต่อไป

<u>2. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการลดปริมาณ *S.* Typhimurium บนผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอย</u>

ผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอยมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ 7.4 และ 5.2 log CFU/g ตรวจไม่พบ *Salmonella spp* . ปนเปื้อนตามธรรมชาติ เมื่อสร้างการปนเปื้อนพบ *S.* Typhimurium 5.7 log CFU/g ในผักทั้งสอง ผักที่แช่สารสกัดหยาบ KUB-AC 20 และ KUB-AC 21 ที่ความเข้มข้น 40% 30นาที ลดซัลโมเนลลาได้สูงสุด (4.1 log CFU/g) แต่เนื้อสัมผัสผักกาดหอมเปื่อยยุ่ย บริเวณรอยตัดและขอบใบมีสีน้ำตาล แครอทมีสีเข้ม เนื้อสัมผัสอ่อนยุ่ยไม่แข็งกรอบ ส่วนชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแช่ลดเซลล์ได้เพียง 0.1 – 0.2log (Table 1.) ในกรณีของผักกาดหอม ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ 10 และ 20% พบว่ามีประสิทธิภาพในการลด *S.* Typhimurium ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 15นาที ในการล้างผักกาดหอม ในทำนองเดียวกันได้เลือกใช้ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 15 นาทีสำหรับแครอทเพื่อทดสอบการเจริญและการรอดชีวิตของ *Salmonella* ในผักที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบและเก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 4 °C ต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่า KUB-AC 21 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่า KUB-AC 20 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสระหว่างสารฆ่าเชื้อ และจุลินทรีย์กลับพบว่าไม่เพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อตามที่คาดหมาย ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ (วชิราภรณ์ , 2545) มีผู้รายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถแทรกตัวเข้าไปในรอยแยกหรือรอยแตกของผัก ทำให้สารฆ่าเชื้อไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ แม้เพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อ (Singh *et al*, 2002)

<u>Table 1</u> Log reduction of *S.* Typhimurium found on produce after soaking in crude extracts from lactic acid bacteria

Condition %), min)	Log Reduction (log CFU/g)			
	KUB – AC 20		KUB – AC 21	
	Lettuce	Shredded carrot	Lettuce	Shredded carrot
Before soaking	0	0	0	0
5 - 15	0.78^{ab}	1.29^{b}	0.84^{ab}	1.55^{b}
5 – 30	0.89^{ab}	1.23^{b}	0.86^{ab}	1.56^{b}
10 – 15	1.05^{b}	1.18^{b}	1.38^{bc}	1.11^{b}
10 – 30	1.09^{b}	1.39^{b}	1.39^{bc}	1.24^{b}
20 – 15	1.14^{bc}	1.12^{b}	2.04^{c}	1.10^{b}
20 – 30	1.48^{bcd}	1.52^{b}	1.86^{c}	1.74^{b}
40 – 15	1.86^{cd}	1.38^{b}	1.92^{c}	2.44^{c}
40 – 30	1.95^{d}	2.67^{c}	2.10^{c}	4.12^{d}
Water –15	0.13^{a}	0.13^{a}	0.13^{a}	0.31^{a}
Water - 30	0.20^{a}	0.20^{a}	0.20^{a}	0.40^{a}

Values within the same column with the different superscript are significantly different ($p \leq 0.05$).

ผักกาดหอมที่เติมเชื้อ Salmonellae ล้างในสารสกัดหยาบ 10% 15 นาทีลดจำนวนเซลล์ที่ปนเปื้อนได้ 1.2 log CFU/g ส่วนในแครอทแช่ที่ 5 % 15นาทีลดได้ .1 4 log CFU/g โดยไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของผักทั้งสอง อย่างไรก็ตาม เซลล์รอดชีวิตในผักกาดหอมเจริญได้ขณะที่เก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 20 วัน ส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตในแครอทหั่นฝอยลดลงและบางตัวอย่างตรวจไม่พบใน 12 วัน แต่สามารถตรวจพบเซลล์บาดเจ็บได้เมื่อเพาะเชื้อด้วยวิธี enrichment (Fig 2)

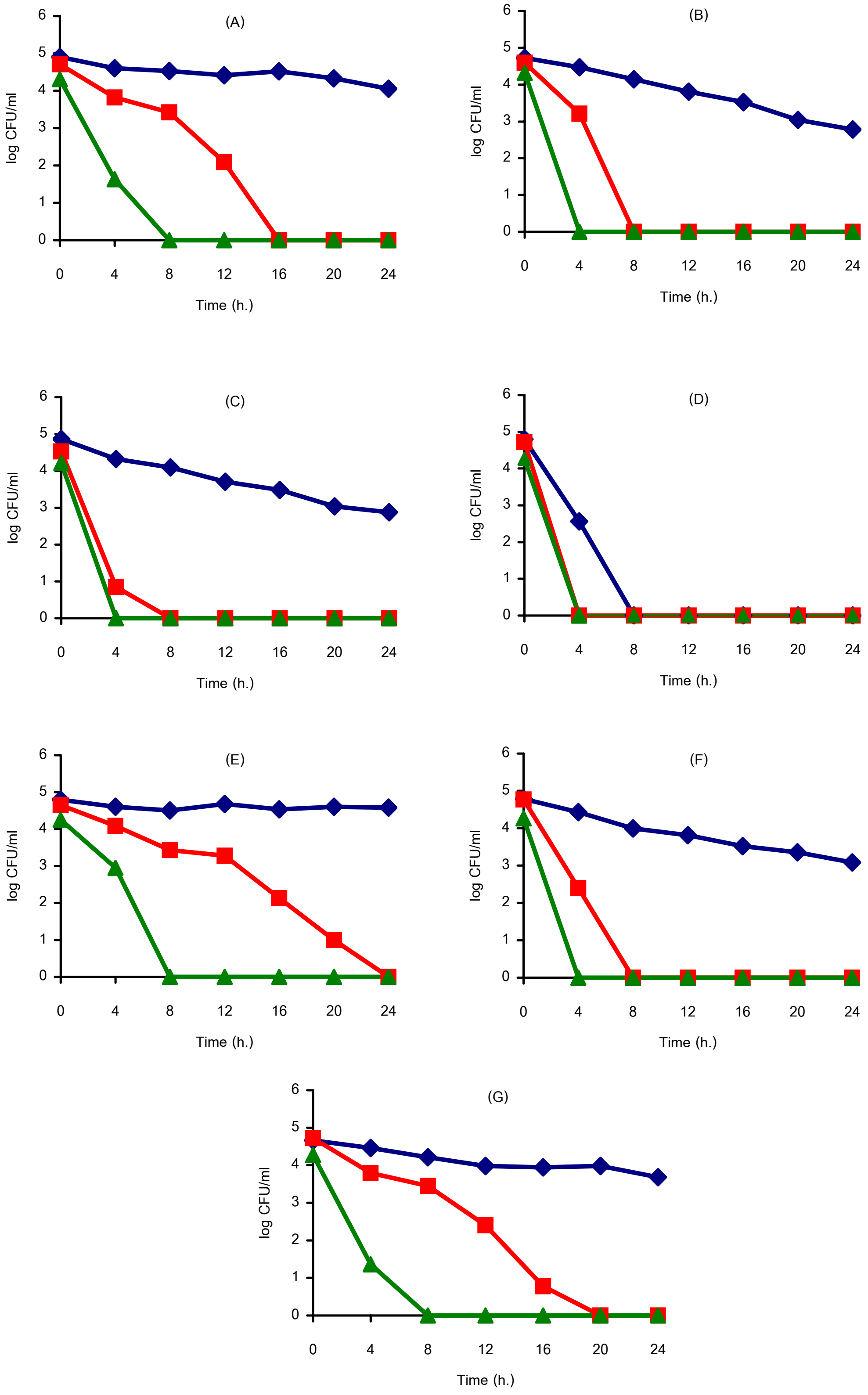

Figure 1 Reduction of *S*. Typhimurium cells in MRS Broth added crude extracts from lactic acid bacteria (A) KUB-AC5; (B) KUB-AC16; (C) KUB-AC20; (D) KUB-AC21; (E) KUB-L0026; (F) KUB-FV4; (G) KUB-FV1-4 at concentration of 30% ◆ 50% ■ and 70% ▲.

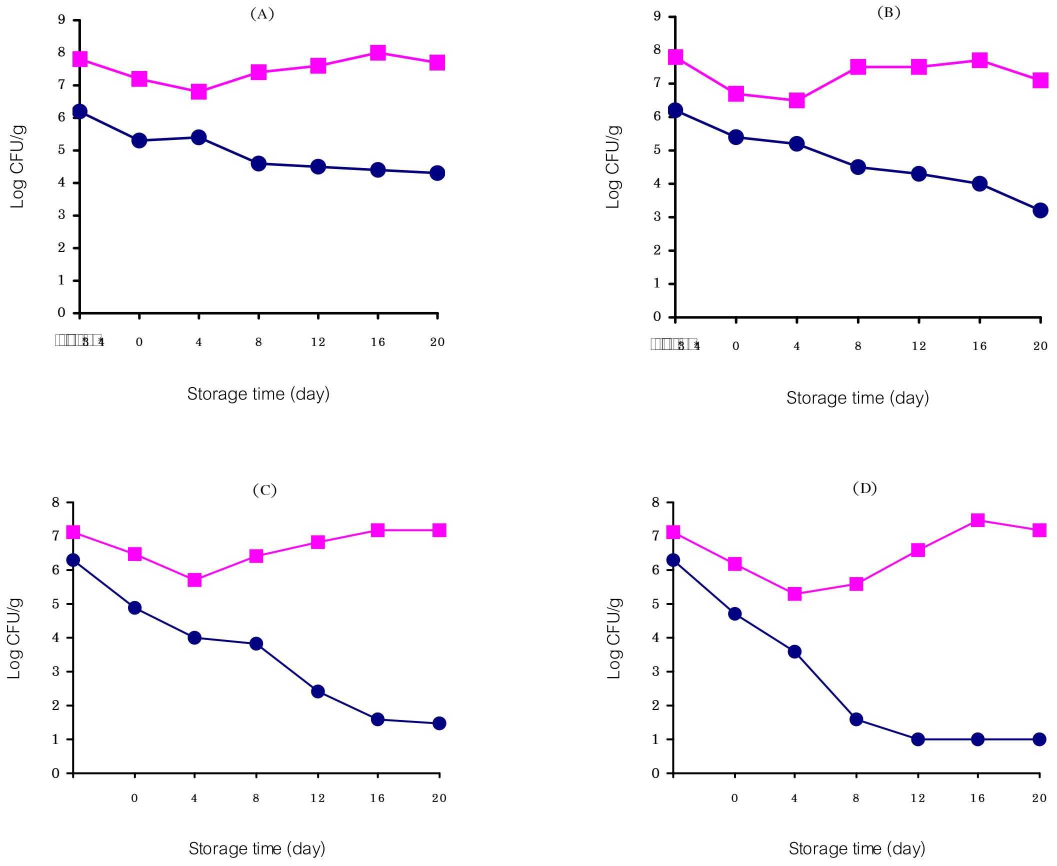

Fig 2 Survival and growth of total aerobic count (■) and *S.* Typhimurium (●) on lettuce after soaking with crude extracts from KUB–AC20 (A) and KUB–AC21 (B) on shredded carrot soaking with crude extracts from KUB-AC20 (C) and KUB-AC21(D)

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถทำลาย *Salmonella* ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในผักสดได้แก่ ผักกาดหอมและแครอทหั่นฝอย พบว่าการใช้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสูงเกินไป (40%) แม้ว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากกว่า 4 log CFU/g แต่ทำให้ลักษณะปรากฏของผักไม่เป็นที่ยอมรับ การใช้สารสกัดหยาบ 10% 15 นาที ช่วยลด *Salmonella* ในผักกาดหอมได้ 1.2 log ในขณะเดียวกันความเข้มข้นที่ 5% 15 นาที ช่วยลดเชื้อก่อโรคชนิดนี้ในแครอทได้ 1.4 log โดยไม่ทำให้ผักเปลี่ยนแปลง จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ แต่ทั้งนี้ต้องศึกษาปัจจัยของความเข้มข้น ชนิดและปริมาณของเชื้อโรคปนเปื้อน ชนิดของผัก และเวลาที่ใช้แช่ให้เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

วชิราภรณ์ เทียมพันธ์. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อเพื่อลดจำนวน *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium ปนเปื้อนบนผักกาดหอม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,กรุงเทพฯ

อรวรรณ ละอองคำ. 2546. การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต KUB-L0026, KUB-FV1-4 และ KUB-FV4-3. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,กรุงเทพฯ

Nitisinparsert, S., P. Bunyeun, K. Sonomoto, V. Nilpsai, P. Sukyai and K. Doi. 2000. Screening and identification of effect thermotolerance lactic acid bacteria producing antimicrobial activity againist *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to antibiotics. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 34: 387-400.

Singh, N., R.K. Singh, A.K. Bhunia and R.L. Stroshine. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *E. coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 35: 720-729.