Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 83-86 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 83-86 (2553)

ผลของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 บนถั่วงอก

The effect of cetylpyridinium chloride and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7 on bean sprout

บุษกร ทองใบ[1]
Bussagon Thongbai[1]

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of cetylpyridinium chloride (CPC) and lactic acid (LA) for inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 which is artificially contaminated into bean sprout. Bean sprout samples were treated with CPC (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 %w/v), LA (0, 0.5, 1.0, and 2.0 %v/v) and combination of CPC with LA (0, 0.5:0.5, 0.5:1.0 and 0.5:2.0 w/v:v/v). The appropriate concentrations of CPC, LA and CPC with LA for reducing *E. coli* O157:H7 in bean sprout were 4.0%w/v (3.38 log reduction), 2.0%v/v (4.46 log reduction) and 0.5:2.0%w/v:v/v (3.30 log reduction), respectively. Due to their antimicrobial activity, CPC and LA are potential sanitizers for washing fresh fruits and vegetables to enhance food safety.

Key word: Cetylpyridinium chloride, Lactic acid, Bean sprout, *Escherichia coli* O157:H7

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินผลของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ที่สร้างสภาพการปนเปื้อนบนถั่วงอก โดยนำถั่วงอกมาล้างด้วยเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (0. 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0%w/v) กรดแลคติก (0, 0.5, 1.0 และ 2.0%v/v) และเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลคติก (0, 0.5:0.5, 0.5:1.0 และ 0.5:2.0 w/v:v/v) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ กรดแลคติก และเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลคติกที่สามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอก คือ 4.0%w/v (3.38 log reduction) 2.0%v/v (4.46 log reduction) และ 0.5:2.0%w/v:v/v (3.30 log reduction) ตามลำดับ จากประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกจึงน่าสนใจนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการล้างผักผลไม้สดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยอาหารต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ เซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์, กรดแลคติก, ถั่วงอก, *Escherichia coli* O157:H7

คำนำ

เนื่องจากในปัจจุบันหลายประเทศในโลกให้ความสนใจหันมาบริโภค seed sprouts ที่ไม่ผ่านการแปรรูปมากขึ้น เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (C.D.C. 1999) แต่การบริโภค seed sprouts เช่น ถั่วงอกหัวโต และถั่วงอกดิบที่ผ่านการผลิตที่ไม่สะอาดอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ (นิพนธ์, 2548) ในสหรัฐอเมริกามีรายงานตรวจพบแบคทีเรีย *Salmonella* และ *Escherichia coli* O157:H7 ในถั่วงอกที่ผลิตจากเมล็ดอัลฟัลฟาและในปี ค.ศ.1996 ประเทศญี่ปุ่นพบผู้ป่วย 9000 รายและเสียชีวิต 17 รายจากการรับประทานถั่วงอกที่มี *E. coli* O157:H7 ปนเปื้อน (นิพนธ์, 2548) Robertson et al. (2002) ได้รายงานการระบาดของโรค salmonellosis และการปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ใน seed sprouts ที่ประเทศแคนาดา เดนมาร์ค ฟินแลนด์ ญี่ปุ่น สวีเดน อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่จะลดการปนเปื้อนใน seed sprouts ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lang et al., 2000) การล้างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (biocidal washes)ในขั้นตอนสุดท้ายของการเพาะจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่นิยมปฏิบัติกันการทดลองนี้จึงใช้ cetylpyridinium chloride (CPC) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น *Salmonella typhimurium, Campylobacter jejuni,* และ *Listeria monocytogenes* (FDA, 1998; Pohlman et al., 2002) CPC เป็นสาร cationic surface active agent จะจับกับฟอสเฟตในส่วนประจุลบของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียทำให้เกิดการบาดเจ็บที่บริเวณผนังเซลล์ได้ ส่วนกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอาหารและอยู่ในgenerally recognized as safe; GRAS (Federal Register, 1982) ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและยังมีคุณสมบัติที่จะยับยั้ง

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44000
[1] Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44000

จุลินทรีย์ (antimicrobial effect)ได้ด้วย (Tamblyn and Conner, 1997) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกต่อการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอก เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคถั่วงอกสด

อุปกรณ์และวิธีการ

การสร้างสภาพการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอก

นำถั่วเขียว 100 กรัมแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4-6 ชม. จากนั้นวางถั่วเขียวบนผ้าขาวบางปลอดเชื้อชั้นละ 25 กรัม รวม 4 ชั้นในถังสะอาดและรดน้ำทุกๆ 4 ชม.ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ คลุมถังด้วยถุงดำเพื่อป้องกันแสงเป็นเวลา 3 วัน เก็บถั่วงอกปลอดเชื้อที่ได้นำมาแช่ในสารแขวนลอยของ *E. coli* O157:H7 (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที เพื่อปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์เกาะติดบนถั่วงอก

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) กรดแลคติก (LA) และเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลคติก (CPC:LA) ต่อการลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอก

นำถั่วงอกที่สร้างสภาพการปนเปื้อนด้วย *E. coli* O157:H7 แล้วมาล้างด้วยการแช่ในสารทดสอบ 3 ชนิดที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ CPC 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0%w/v, LA 0, 0.5, 1.0 และ 2.0%v/v และ CPC:LA 0, 0.5:0.5, 0.5:1.0 และ 0.5:2.0 %w/v:v/v เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 วินาทีเพื่อล้างสารทดสอบที่เหลือออกไป ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* O157:H7 ที่รอดชีวิตบนถั่วงอกด้วยวิธี spread plate บน Sorbital MacConkey agar และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. และรายงานผลเป็น log CFU/g

ผล

จากผลการศึกษาผลของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) กรดแลคติก (LA) และ CPC:LA ต่อการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่สร้างสภาพการปนเปื้อนบนถั่วงอก พบว่า CPC ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีความสามารถในการลดปริมาณ *E. coli* O157:H7บนถั่วงอกได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Table 1) โดย CPC 4.0%w/v สามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7

Table 1 Viable count of *E. coli* O157:H7 on bean spout treated with CPC

CPC(%w/v)	Log CFU/g	
	Viable cells	Reduction
0	6.85±0.04[d]	-
0.5	6.26±0.01[c]	0.60±0.05[a]
1.0	6.16±0.01[c]	0.70±0.05[a]
2.0	4.62±0.20[b]	2.24±0.16[b]
4.0	3.48±0.01[a]	3.38±0.05[c]

CPC= Cetylpyridinium chloride (%w/v), 0% = Sterile distilled water (control)

[a-d] Different letters showed significant difference at $p<0.05$

ที่เกาะติดบนถั่วงอกได้มากที่สุดถึง 3.38 log CFU/g และเมื่อใช้ LA ล้างถั่วงอกที่มีการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7 ก็พบว่าสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ดีเช่นกัน โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของ LA ที่ใช้คือ 2.0%v/v จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอก (4.46 log CFU/g) ($p<0.05$) แสดงใน Table 2

Table 2 Viable count of *E. coli* O157:H7 on bean spout treated with LA

LA (%v/v)	Log CFU/g	
	Viable cells	Reduction
0	6.90±0.21[c]	-
0.5	4.40±0.11[b]	2.08±0.10[a]
1.0	4.58±0.15[b]	2.31±0.35[a]
2.0	2.44±0.28[a]	4.46±0.09[b]

LA= Lactic acid (%v/v), 0% = Sterile distilled water (control)

[a-d] Different letters showed significant difference at $p<0.05$

นอกจากนี้เมื่อใช้สารทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในการล้างถั่วงอกเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน โดยแปรความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อให้ทำงานแบบเสริมฤทธิ์กันต่อการลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 ที่เกาะติดบนถั่วงอก ผลการทดลองแสดงดัง Table 3 พบว่า CPC:LA ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบให้ผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่ CPC:LA 0.5:2.0%w/v:v/v นั้นสามารถลดปริมาณของ *E. coli* O157:H7 ที่เกาะติดบนถั่วงอกสดได้มากที่สุด 3.30 log CFU/g

Table 3 Viable count of *E. coli* O157:H7 on bean spout treated with CPC:LA

CPC:LA (%w/v:v/v)	Log CFU/g	
	Viable cells	Reduction
0	6.83±0.06[d]	-
0.5:0.5	4.86±0.13[c]	2.90±1.02[ns]
0.5:1.0	3.43±0.05[b]	3.03±0.99
0.5:2.0	2.91±0.17[a]	3.30±0.94

CPC:LA = Cetylpyridinium chloride:Lactic acid (%w/v:v/v), 0% = Sterile distilled water (control)

[a-d] Different letters showed significant difference at $p<0.05$

[ns] not significantly different at $p>0.05$

วิจารณ์ผลและสรุป

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ CPC, LA และ CPC:LA ต่อการลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอก พบว่าทั้ง CPC LA และ CPC:LA มีประสิทธิภาพในการยังยั้ง *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอกได้ดี โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPC คือ 4.0%w/v เพราะสามารถลดปริมาณของ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอกได้มากที่สุด (3.38 log CFU/g) โดย CPC ซึ่งเป็นสารประกอบ quaternary ammonium compound จะสามารถจับกับฟอสเฟตที่เซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์โดยผ่านเข้ามาทาง selective permeability ของเซลล์เมมเบรนส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ กลายพันธุ์และตายในที่สุด (Pohlman et al., 2002) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang et al. (2001) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของ CPC ในการแช่ผักตัดแต่งเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน พบว่า CPC ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 %w/v สามารถลดปริมาณ *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 และ *Sal. typhimurium* ได้ดี ในขณะที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LA คือ 2.0%v/v โดยสามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 4.40 log CFU/g ซึ่ง LA จะมีผลต่อผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียและเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกรดนิวคลีอิคภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและตายในที่สุด (Yuk et al., 2007) นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันจะทำให้เกิดการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของ CPC และ LA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนอาหาร โดยค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPC:LA คือ 0.5:2.0 %w/v:v/v ซึ่งสามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 ที่เกาะติดบนถั่วงอกได้ 3.30 log CFU/g สอดคล้องกับรายงานของ Zhang and Farber (1999) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้กรดแลคติก

กรดอะซิติก และการใช้กรดร่วมกับสารละลายคลอรีนต่อการลดปริมาณ *L. monocytogenes* ในผักสด (ผักกาดหอมและกะหล่ำปลี) พบว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับสารละลายคลอรีนสามารถปริมาณ *L. monocytogenes* ในผักสดได้ดีกว่าการใช้กรดหรือสารละลายคลอรีนเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าทั้ง CPC และ LA สามารถใช้เป็นสารสำหรับล้างผักผลไม้สดและอาหารประเภท minimally processed vegetables เช่น ถั่วงอกสด ผักสดหรือผักตัดแต่งแช่เย็นได้ ซึ่งจะรักษาคุณภาพด้านจุลชีววิทยา และลักษณะปรากฏให้ใกล้เคียงธรรมชาติของผักสด นอกจากนี้ยังช่วยยืดอายุการวางจำหน่ายและเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคได้อีกด้วย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกองส่งเสริมและพัฒนางานวิจัยมหาวิทยาลัยมหาสารคามสำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2549 และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2548. ถั่วงอก. ระบบข้อมูลผักมหาวิทยาลัยแม่โจ้ สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Federal Register. 1982. Rules and regulations. Vol. 47, No. 123. Part 184, Friday, June 25

Food and Drug Administration. 1998. In: Subcommitee report on Cetylpyridinium chloride. http://www.fda.gov

Lang, M. E., B. H. Ingham. and S. C. Ingham. 2000. Efficacy of novel organic cid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. Int. J. Food Microbiol. 58: 73-82.

Pohlman, F. W., M. R. Stivarius, K. S. McElyea. and A. L. Waldroup. 2002. Reduction of *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, coliforms, aerobic bacteria, and improvement of ground beef color using trisodiumphosphate or cetylpyridinium chloride before grinding. Meat Sci. 60: 349-356.

Robertson, L., G. Johannessen, B. K. Gjerde. and S. Loncarevic. 2002. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. Int. J. Food Microbiol. 75: 119-126.

Tamblyn, K. C. and D. E. Conner. 1997. Bacterial activity of organic acids against *Salmonella typhimurium* attached to broiler chicken skin. J. Food Prot. 60: 629-633.

Wang, H., Y. Li. and M. F. Slavik, 2001. Efficacy of cetylpyridinium chloride in immersion treatment for reducing populations of pathogenic bacteria on fresh-cut vegetables. J. Food Prot. 64(12):2071-2074.

Yuk, H., M. Yoo, J. Yoon, D. L. Marshall. and D. Oh. 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(5):548-553.

Zhang, S. and J. M. Farber. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. Food Microbiol. 13:311-321.