Agric. Sci. Innov. J. 55 : 1 (Suppl.) : 56 - 59 (2024) ว. วิทย. นวัต. กษ. 55 : 1 (พิเศษ) : 56 - 59 (2567)

ประสิทธิภาพของความร้อนต่ำร่วมกับกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้งอีโคไลที่ปนเปื้อนถั่วงอกสด
The Efficacy of Mild Heat Treatments Combined with Organic Acids to Inactivate *E. coli* Contaminated on Fresh Mung Bean Sprouts

บุษกร ทองใบ[1] และสิริพร ลาวัลย์[1]
Bussagon Thongbai[1] and Siriporn Lawan[1]

Abstract

The aim of this research was to evaluate effect of mild heat treatments combined with organic acids to inactivate *Escherichia coli* of fresh mung bean sprouts. *E. coli* was inoculated on mung bean sprouts to achieve initial population of 6.30 log CFU/g. The inoculated bean sprouts were subjected to sterile distilled water (SDW) (control), 0.5%(v/v) lactic acid (LA), 0.5%(v/v) acetic acid (AA) and 0.5%(w/v) fumaric acid (FA) at different temperatures (30, 40 and 50 °C) for 5 min. Results indicated that FA at 50 °C was the most effective combination treatment for controlling *E. coli* count on bean sprouts ($p \leq 0.05$). In addition, the efficacy of FA in combination with mild heat (50 °C) to achieve reduction in *E. coli* of fresh sprouts during storage (4-5 °C, 5 days) were determined. *E. coli* count of FA treated bean sprouts were 3.15 (day 0) and 5.25 log CFU/g (day 5). Meanwhile *E. coli* population of SDW treated bean sprouts were significantly increase from 4.69 (day 0) to 7.84 log CFU/g (day 5) ($p \leq 0.05$). The results of this study showed that 0.5%(w/v) FA prepared at 5 0 °C was presented a potential washing method to decontaminate foodborne pathogen on fresh bean sprout and showed good appearance after subsequent 5 days storage.

Keywords: fumaric acid, lactic acid, acetic acid

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของความร้อนต่ำร่วมกับกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้งอีโคไล (*Escherichia coli*) ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกสด โดยนำถั่วงอกสดที่สร้างสภาวะปนเปื้อนด้วย *E. coli* 6.30 log CFU/g มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (SDW) เป็นชุดควบคุม กรดแลคติก (LA) 0.5%(v/v) กรดแอซีติก (AA) 0.5%(v/v) และกรดฟูมาริก (FA) 0.5%(w/v) ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าสภาวะการล้างที่เหมาะสมได้แก่ การล้างด้วย FA ที่อุณหภูมิ 50 °C มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *E. coli* ได้มากที่สุด ($p \leq 0.05$) และศึกษาประสิทธิภาพของ FA ที่อุณหภูมิ 50 °C ต่อการควบคุมปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกสดที่เก็บรักษาที่ 4-5 °C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณ *E. coli* ที่รอดชีวิตในถั่วงอกที่ล้างด้วย FA เท่ากับ 3.15 (วันที่ 0) และ 5.25 log CFU/g (วันที่ 5) ในขณะที่ถั่วงอกที่ล้างด้วย SDW (ชุดควบคุม) มีปริมาณ *E. coli* ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 4.69 (วันที่ 0) เป็น 7.84 log CFU/g (วันที่ 5) ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า FA 0.5%(w/v) อุณหภูมิ 50 °C เป็นวิธีการล้างที่มีศักยภาพในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในถั่วงอกสดและยังคงมีลักษณะทางกายภาพที่ดีหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

คำสำคัญ: กรดฟูมาริก กรดแลคติก กรดแอซีติก

คำนำ

การบริโภคผักสดและพืชงอกสด เช่น ถั่วงอก ถั่วงอกหัวโต ไควาเระ ต้นอ่อนทานตะวัน ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความต้องการคุณค่าทางโภชนาการจากการบริโภคผักสดและพืชงอกสด ได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย และยังเป็นแหล่งของใยอาหารที่สำคัญช่วยป้องกันโรคท้องผูกและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ถั่วงอก (mung bean sprout) เป็นพืชงอกที่คนไทยรู้จักกันดีและนิยมรับประทานมากที่สุด โดยรับประทานทั้งรูปแบบถั่วงอกสดหรือดิบและถั่วงอกสุก แต่การบริโภคถั่วงอกสดอาจจะพบกับปัญหาสำคัญคือการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (foodborne pathogens) เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุ

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150
[1] Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150

ของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหล่านี้อาจเกิดได้จากมีจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารปนเปื้อนมากับเมล็ดถั่วเขียวก่อนการเพาะให้งอกอยู่แล้ว เมื่อนำเมล็ดถั่วเขียวมาเพาะเป็นถั่วงอกโดยต้องใช้สภาวะในการเพาะที่มีความชื้นและอุณหภูมิค่อนข้างสูง จึงเป็นสภาวะที่จุลินทรีย์ก็จะสามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณขึ้นได้ด้วยในระหว่างการเพาะจึงทำให้พบว่ามีจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารปนเปื้อนในถั่วงอกได้ รวมทั้งการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเพาะถั่วงอกที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และระหว่างการวางจำหน่าย ดังนั้น การลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกก่อนการวางจำหน่ายและบริโภคจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากสามารถช่วยยืดอายุการวางจำหน่ายและเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค ถั่วงอกสดได้ แต่การล้างถั่วงอกด้วยน้ำสะอาดไม่สามาถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ปนเปื้อนมาได้ โดยมีคำแนะนำให้ใช้สารละลายแคลเซียมไฮโพคลอไรต์ (คลอรีนอิสระ 20,000 ppm) สำหรับการล้างเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพืชก่อนทำการงอก (Food and Drug Administration, 1999) แต่ก็มีรายงานว่าสารฆ่าเชื้อประเภทสารประกอบคลอรีน จะมีอันตรายจากสารไตรฮาโลมีเทนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่เกิดจากคลอรีนทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ในน้ำแล้วอาจตกค้างหลังการล้างได้ ซึ่งการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อประเภทกรดอินทรีย์สำหรับการล้างผักและพืชงอกเพื่อลดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารจึงน่าสนใจ เนื่องจากถ้ามีกรดอินทรีย์ตกค้างก็จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค และเมื่อใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนต่ำที่ไม่ทำลายคุณค่าทางโภชนาการและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักและพืชงอกน่าจะมีประสิทธิภาพในการลดจุลินทรีย์ได้มากขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของความร้อนต่ำร่วมกับกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนถั่วงอกสดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยอาหารให้ผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมถั่วงอก และสร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *E. coli*

ถั่วงอกสดเพาะใหม่ที่ซื้อจากร้านเพาะและขายส่งถั่วงอกในอำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม โดยคัดเลือกถั่วงอกสดที่มีลักษณะสมบูรณ์ดี นำมาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก ทำให้ถั่วงอกสดปลอดเชื้อด้วยการล้างด้วยเอทานอล (75%) เป็นเวลา 30 วินาที (Zhang *et al*., 2011) และล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง และทำให้สะเด็ดน้ำในตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class II) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำถั่วงอกสดปลอดเชื้อมาแช่ในสารแขวนลอยของ *E. coli* (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อสร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *E. coli* และวางถั่วงอกในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ *E. coli* เกาะติดแน่นบนถั่วงอก สุ่มเก็บตัวอย่างถั่วงอกมาตรวจหาปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนเริ่มต้น ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar (MAC) บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานปริมาณจุลินทรีย์เป็น log CFU/g

การศึกษาประสิทธิภาพของความร้อนต่ำกับกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนถั่วงอกสด

นำถั่วงอกที่ผ่านการสร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *E. coli* มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (SDW) กรดแลคติก (LA) 0.5%(v/v) กรดแอซีติก (AA) 0.5%(v/v) และกรดฟูมาริก (FA) 0.5%(w/v) ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Huang and Chen, 2011) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (10 วินาที) 2 ครั้ง เพื่อล้างสารทดสอบอาจตกค้างออกจากถั่วงอก วางไว้ให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ที่รอดชีวิตในถั่วงอกสด วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศึกษาประสิทธิภาพของกรดฟูมาริกที่ 50 °C ต่อการควบคุมปริมาณ *E. coli* ในถั่วงอกสดที่เก็บรักษาที่ 4-5 °C เป็นเวลา 5 วัน

นำถั่วงอกสดมาสร้างสภาพปนเปื้อนด้วย *E. coli* (10^5 CFU/ml) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) และกรดฟูมาริก (FA) 0.5% (w/v) และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (10 วินาที) 2 ครั้ง เพื่อล้างกรดที่อาจตกค้างออกไป วางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำถั่วงอกสดที่ล้างแล้วมาบรรจุในถาดโฟม (polystyrene) ปลอดเชื้อขนาด 11.5x11.5x3 เซนติเมตร และหุ้มด้วยฟิล์มยืด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5 °C เป็นเวลา 5 วัน ทำการสุ่มตัวอย่างถั่วงอกที่เก็บรักษาในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ที่รอดชีวิต วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของความร้อนต่ำร่วมกับกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกสดแสดงใน Table 1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการล้างถั่วงอกสดด้วยกรดอินทรีย์ต่างชนิดร่วมกับความร้อนต่ำมีผลต่อการลดปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกอย่างมีนัยสำคัญ โดยการล้างถั่วงอกด้วย FA ที่มีอุณหภูมิ 50 °C มีการรอดชีวิตของ *E. coli* น้อยที่สุดคือ 3.79 log CFU/g ($p \leq 0.05$) และการล้างด้วย SDW ที่อุณหภูมิ 30 °C มีการรอดชีวิตของ *E. coli* มากที่สุดคือ 5.43 log CFU/g ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า FA ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นสภาวะการล้างที่เหมาะสม เพราะสามารถลดปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกได้มากโดยลดได้ถึง 2.51 log reduction เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกเริ่มต้น ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของกรดอินทรีย์ LA, AA และ FA ซึ่งเป็นกรดอ่อนที่มีการแตกตัวในน้ำได้น้อยจึงอยู่ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวซึ่งสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปภายในเซลล์ได้ดีส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์ของแบคทีเรียมีค่าลดต่ำลงและมีค่าความเป็นกรดสูงขึ้น ทำให้เกิดการแตกตัวของไฮโดรเจนไอออนจำนวนมาก ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียได้รับบาดเจ็บและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ในที่สุด และเมื่อทำให้กรดอินทรีย์มีอุณหภูมิสูงขึ้นระดับความร้อนต่ำ (40 และ 50 °C) ก็พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจะเพิ่มสูงขึ้น เพราะเกิดการรั่วของโปรตีน (protein leakage)เกิดเนื่องจากการรบกวนการทำงานของ outer membrane และทำให้ outer membrane เกิดความเสียหายจึงส่งผลให้เกิดการรั่วของโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการใช้ความร้อนต่ำร่วมกับกรดอินทรีย์จึงช่วยส่งเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ให้เพิ่มมากยิ่งขึ้น (Chen *et al*., 2022) แต่ระดับของความร้อนต่ำที่ใช้นี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่ไม่พึงประสงค์ของผักสดที่ทำการล้างด้วยวิธีนี้ ซึ่งผลการทดลองใน Table 1 สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Dikici *et al*. (2015) ที่ใช้ความร้อนต่ำ 50 °C ร่วมกับกรดแลคติก 2.5% สามารถต่อปริมาณของ *E. coli* O157:H7, O103, O111, O145 และ O26 ที่เติมในผักโขมและถั่วเหลืองงอกได้มากที่สุด

Table 1 Effect of mild heat treatments combined with organic acids on *E. coli* contaminated fresh bean sprouts

Treatments	Populations (log CFU/g)		
	30°C	40°C	50°C
SDW	5.43 ± 0.04^{dB}	5.08 ± 0.02^{cA}	5.01 ± 0.09^{cA}
LA	4.49 ± 0.02^{bB}	4.10 ± 0.03^{aA}	4.03 ± 0.04^{bA}
AA	4.90 ± 0.04^{cB}	4.92 ± 0.04^{bB}	3.97 ± 0.04^{bA}
FA	4.34 ± 0.01^{aB}	4.16 ± 0.02^{aB}	3.79 ± 0.01^{aA}

$^{a-d}$ means in the column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)
$^{A-B}$ means in the row followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)
Initial *E. coli* contaminated on fresh bean sprouts: 6.30±0.02 log CFU/g
SDW: Sterile distilled water (control), LA: Lactic acid (0.5%v/v),
AA: Acetic acid (0.5%v/v), FA: Fumaric acid (0.5% w/v)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ FA ที่อุณหภูมิ 50 °C ต่อการควบคุมปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในถั่วงอกสดที่เก็บรักษาที่ 4 - 5 °C เป็นเวลา 5 วัน (Table 2) พบว่าปริมาณของ *E. coli* ที่รอดชีวิตในถั่วงอกที่ล้างด้วย FA ในวันที่ 0 ของการเก็บรักษาเท่ากับ 3.15 log CFU/g และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นจนถึง 5.25 log CFU/g ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ในขณะที่ถั่วงอกที่ล้างด้วย SDW (ชุดควบคุม) มีปริมาณ *E. coli* ที่รอดชีวิตในวันที่ 0 ของการเก็บรักษา 4.69 log CFU/g มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาโดยในวันที่ 5 ของการเก็บรักษามีปริมาณ *E. coli* สูงถึง 7.84 log CFU/g ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า FA 0.5%(w/v) อุณหภูมิ 50 °C เป็นวิธีการล้างที่มีศักยภาพในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในถั่วงอกสดได้ดี และเมื่อทำการเก็บรักษาถั่วงอกสดหลังการล้างด้วย FA ที่อุณหภูมิต่ำ (4 – 5 °C) จะสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* ให้เพิ่มขึ้นช้ากว่าการล้างด้วย SDW ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์ของ *E. coli* บางส่วนเป็นเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำมาก (4 – 5 °C) จึงไม่ใช่สภาวะที่จะซ่อมแซมตัวเองได้จึงทำให้พบการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า *E. coli* ในถั่วงอกที่ล้างด้วย

SDW ซึ่งมีเซลล์ที่ปกติไม่ได้บาดเจ็บ นอกจากนี้ยังพบว่าตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาถั่วงอกสดที่ล้างด้วย FA ที่อุณหภูมิ 50 ℃ ถั่วงอกสดยังคงมีลักษณะทางกายภาพที่ดีหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

Table 2 *E. coli* counts of fumaric acid (50 ℃) treated fresh bean sprouts storage at 4-5 ℃ for 5 days

Storage times (days)	Viable counts (log CFU/g)	
	SDW	FA
0	4.69 ± 0.06^{aB}	3.12 ± 0.00^{aA}
1	6.07 ± 0.00^{bB}	3.33 ± 0.02^{bA}
3	6.88 ± 0.03^{cB}	5.09 ± 0.04^{cA}
5	7.84 ± 0.01^{dB}	5.25 ± 0.01^{dA}

$^{a-d}$ means in the column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)
$^{A-B}$ means in the row followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)
Initial *E. coli* contaminated on fresh bean sprouts: 5.11±0.85 log CFU/g
SDW: Sterile distilled water (control), FA: Fumaric acid (0.5% w/v)

สรุป

วิธีการล้างที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนถั่วงอกสดคือ การล้างด้วยกรดฟูมาริก 0.5 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 50 ℃ เป็นเวลา 5 นาที และสามารถควบคุมปริมาณ *E. coli* ในถั่วงอกสดที่เก็บรักษาที่ 4 – 5 ℃ เป็นเวลา 5 วัน โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพที่ไม่พึงประสงค์ (adverse effects) ของถั่วงอกสด จึงถือได้ว่าวิธีการใช้ความร้อนต่ำ (50 ℃) ร่วมกับกรดฟูมาริกเป็นวิธีการที่มีศักยภาพสำหรับใช้ล้างถั่วงอกสดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยด้านจุลชีววิทยาและลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายในถั่วงอกสดได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่และสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chen, L., Q. Liu, X. Zhao, H. Zhang, X. Pang and H. Yang. 2022. Inactivation efficacies of lactic acid and mild heat treatments against *Escherichia coli* strains in organic broccoli sprouts. Food Control 133: 108577.

Dikici, A., A. Koluman and M. Calicioglu. 2015. Comparison of effects of mild heat combined with lactic acid on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7, O103, O111, O145 and O26 inoculated to spinach and soybean sprout. Food Control 50: 184-189.

Food and Drug Administration. 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. [Online]. Available Source: https://webharvest.gov/peth04/20041030223230/http://www.cfsan.fda.gov/~mow/sprouts2.html (2 August 2023).

Huang, Y. and H. Chen. 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. Food control 22 :1178-1183.

Zhang, C., Z. Lu, Y. Li, Y. Shang, G. Zhang and W. Cao. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* on mung bean seeds and sprouts by slightly acidic electrolyzed water. Food Control 22(5): 792 - 796.