Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 175-178 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 175-178 (2554)

ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลกติกต่อ*Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอก

Antimicrobial Effect of Cetylpyridinium Chloride and Lactic Acid on *Staphylococcus aureus* inoculated on Bean Sprouts

บุษกร ทองใบ[1]
Bussagon Thongbai[1]

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial efficacy of cetylpyridinium chloride (CPC) and lactic acid (LA) on *Staphylococcus aureus* which was artificially inoculated on bean sprouts. 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 the combination of CPC-LA (0, 0.5:0.5, 0.5:1.0 and 0.5:2.0 w/v:v/v). The results showed that the appropriate concentrations of CPC, LA and CPC-LA for inhibiting *S. aureus* on bean sprouts were 2.0%w/v (2.57 log CFU/g), 2.0%v/v (3.43 log CFU/g) and 0.5:2.0%w/v:v/v (3.16 log CFU/g), respectively. According to the results, the antimicrobial activity of CPC and LA have a potential application as sanitizers for washing fresh produce to enhance food safety.

Keyword: cetylpyridinium chloride, lactic acid, bean sprout, *Staphylococcus*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์(CPC) และกรดแลคติก (LA) ต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนถั่วงอก โดยถั่วงอกถูกสร้างสภาพการปนเปื้อนด้วย *S. aureus* (10^6 CFU/ml) จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (0. 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0%w/v) กรดแลคติก (0, 0.5, 1.0 และ 2.0%v/v) และเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลคติก (CPC–LA) (0, 0.5:0.5, 0.5:1.0 และ 0.5:2.0 w/v:v/v) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์ กรดแลคติก และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลกติกที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ที่ปนเปื้อนถั่วงอกคือ 2.0%w/v (2.57 log CFU/g) 2.0%v/v (3.43 log CFU/g) และ 0.5:2.0%w/v:v/v (3.16 log CFU/g) ตามลำดับ จากประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทธิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกได้นี้ทำให้เห็นถึงศักยภาพของสารนี้ที่สามารถนำไปใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อในการล้างผลิตผลการเกษตรเพื่อเพิ่มความปลอดภัยของอาหาร

คำสำคัญ: เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์, กรดแลกติก, ถั่วงอก, *Staphylococcus*

คำนำ

การบริโภค seed sprouts ที่ไม่ผ่านการแปรรูปได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน เพราะเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่ seed sprouts เช่น ถั่วงอกหัวโต และถั่วงอกสดที่ผลิตไม่ถูกสุขลักษณะอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ในปี ค.ศ.1996 ประเทศญี่ปุ่นพบผู้ป่วย 9000 รายและเสียชีวิต 17 รายจากการรับประทานถั่วงอกที่มี *Escherichia coli* O157:H7ปนเปื้อน (นิพนธ์, 2548) และยังพบรายงานการระบาดของโรค salmonellosis และการปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ใน seed sprouts ที่แคนาดา เดนมาร์ก ฟินแลนด์ ญี่ปุ่น สวีเดน อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา (Robertson *et al*., 2002) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ใน seed sprouts ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการใช้สารฆ่าเชื้อ (biocidal washes) สำหรับการล้างผลิตผลในขั้นตอนสุดท้ายของการเพาะจึงยังเป็นขั้นตอนสำคัญที่ปฏิบัติกันอยู่ เนื่องจาก cetylpyridinium chloride (CPC) มีคุณสมบัติเป็นสาร cationic surface active agent ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Salmonella typhimurium, Campylobacter jejuni* และ *Listeria monocytogenes* (FDA, 1998) โดยจะจับกับฟอสเฟตในส่วนประจุลบของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียทำให้ผนังเซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ในgenerally recognized as safe (Federal Register, 1982) และมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial effect) ได้ด้วย

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

(Tamblyn and Conner, 1997) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลกติกต่อการยับยั้ง *S. aureus* ที่ปนเปื้อนถั่วงอก

อุปกรณ์และวิธีการ

สร้างสภาพการปนเปื้อนของ *S. aureus* บนถั่วงอก

นำเมล็ดถั่วเขียว 100 กรัมแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4-6 ชม. จากนั้นวางถั่วเขียวบนผ้าขาวบางปลอดเชื้อชั้นละ 25 กรัม รวม 4 ชั้นในถังสะอาดและรดน้ำทุกๆ 4 ชม.ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ คลุมถังด้วยถุงดำเพื่อป้องกันแสงเป็นเวลา 3 วัน เก็บถั่วงอกที่ได้นำมาแช่ในสารแขวนลอยของ *S. aureus* (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที เพื่อปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์เกาะติดบนถั่วงอก

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) กรดแลกติก (LA) และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลกติก (CPC-LA) ต่อการลดปริมาณ *S. aureus* บนถั่วงอก

นำถั่วงอกที่สร้างสภาพการปนเปื้อนด้วย *S. aureus* มาล้างด้วยการแช่ในสารทดสอบ 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 *S. aureus* ที่รอดชีวิตบนถั่วงอกด้วยวิธี spread plate บน Baird-Parker agar ผสมด้วย EY tellurite enrichment และบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลเป็น log CFU/g

ผล

ผลของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) กรดแลกติก (LA) และ CPC-LA ต่อการยับยั้ง *S. aureus* ที่สร้างสภาพการปนเปื้อนบนถั่วงอก พบว่า CPC ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีความสามารถในการลดปริมาณ *S. aureus* บนถั่วงอกได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Table 1) โดย CPC 2.0 และ 4.0%w/v พบปริมาณ *S. aureus* ที่รอดชีวิตบนถั่วงอกไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) คือ 2.57 และ 2.43 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อใช้ LA ล้างถั่วงอกที่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* ก็พบว่าความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมในการยับยั้ง *S. aureus* บนถั่วงอก คือ 2.0%v/v พบการรอดชีวิตของ *S. aureus* บนถั่วงอกน้อยที่สุด (3.43 log CFU/g) ($p<0.05$) ดังแสดงใน Table 2 นอกจากนี้เมื่อใช้สารทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในการล้างถั่วงอกเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยแปรความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อให้ทำงานแบบเสริมฤทธิ์กันต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ที่เกาะติดบนถั่วงอก ผลการทดลองแสดงใน Table 3 พบว่า CPC-LA ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ CPC-LA 0.5:2.0%w/v:v/v ที่ใช้ล้างถั่วงอกนั้นพบปริมาณการรอดชีวิตของ *S. aureus* ที่เกาะติดถั่วงอกน้อยที่สุด 3.16 log CFU/g

Table 1 Viable count of *S. aureus* on bean sprouts treated with CPC

CPC(%w/v)	log CFU/g
0	5.72 ± 0.15^{d}
0.5	3.66 ± 0.11^{c}
1.0	2.98 ± 0.02^{c}
2.0	2.57 ± 0.04^{a}
4.0	2.43 ± 0.06^{a}

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

$^{a-d}$ Different letters indicate significant difference at $p<0.05$

Table 2 Viable count of *S. aureus* on bean sprouts treated with LA

LA (%v/v)	log CFU/g
0	5.46±0.11[d]
0.5	4.04±0.11[c]
1.0	3.78±0.16[b]
2.0	3.43±0.11[a]

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

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

Table 3 Viable count of *S. aureus* on bean sprouts treated with CPC-LA

CPC-LA (%w/v:v/v)	log CFU/g
0	5.99±0.04[d]
0.5:0.5	3.75±0.07[c]
0.5:1.0	3.48±0.02[b]
0.5:2.0	3.16±0.09[a]

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

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

วิจารณ์และสรุป

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ CPC, LA และ CPC-LA ต่อการยับยั้ง *S. aureus* ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอก พบว่าทั้ง CPC LA และ CPC-LA มีประสิทธิภาพในการยังยั้ง *S. aureus* บนถั่วงอกได้ดี โดยความเข้มข้น CPC ที่ 2.0 และ 4.0 %w/v มีปริมาณการรอดชีวิตของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอกได้น้อยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 2% w/v เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า ซึ่งช่วยลดต้นทุนการล้างและลดโอกาสที่จะเกิดลักษณะที่ไม่ต้องการจากการใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงในการล้างผักซึ่งส่งผลเสียต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (adverse effects) ของถั่วงอกเวลาที่ผู้บริโภคนำไปรับประทานได้ ดังนั้นความเข้มข้นของ CPC ที่เหมาะสมสำหรับลดการปนเปื้อนของ *S. aureus* บนถั่วงอก คือ 0.2%w/v โดย CPC เป็นสารประกอบ quaternary ammonium compound ที่สามารถจับกับฟอสเฟตที่เซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้โดยผ่านเข้ามาทาง selective permeability ของเซลล์เมมเบรนและส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บและตายของจุลินทรีย์ในที่สุด (Pohlman *et al*., 2002) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al*. (2001) ที่รายงานประสิทธิภาพของ CPC ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนผักตัดแต่ง โดยพบว่า CPC ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 %w/v สามารถลดปริมาณ *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 และ *S. typhimurium* ได้ดี ในขณะที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LA คือ 2.0%v/v โดยมีการรอดชีวิตของ *S. aureus* น้อยที่สุด3.43 log CFU/g ซึ่ง LA ไปมีผลต่อผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียและเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ระดับ pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลงและไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและตายในที่สุด (Yuk *et al*., 2007) นอกจากนั้นเมื่อใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันเพื่อศึกษาการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของ CPC-LA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนอาหาร โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPC-LA คือ 0.5:2.0 %w/v:v/v เพราะพบปริมาณการรอดชีวิตของ *S. aureus* บนถั่วงอกน้อยที่สุด 3.16 log CFU/g สอดคล้องกับรายงานของ Zhang and Farber (1996) ที่รายงานประสิทธิภาพของกรดแลกติก กรดอะซิติก และการใช้กรดร่วมกับสารละลายคลอรีนต่อการลดปริมาณ *L. monocytogenes* ในผักกาดหอมและกะหล่ำปลี พบว่ากรดแลกติกร่วมกับสารละลายคลอรีนมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *L. monocytogenes* ได้ดีกว่าการใช้แต่กรดแลกติก กรดอะซิติก หรือสารละลายคลอรีนเพียงอย่างเดียว ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าทั้ง CPC และ LA สามารถใช้เป็นสารสำหรับล้างผลิตผลทางการเกษตรและอาหารประเภทพร้อมปรุง เช่น ถั่วงอก ผักสดหรือผักผลไม้ตัดแต่งแช่เย็นได้ โดยจะช่วยรักษาคุณภาพด้านจุลชีววิทยาและลักษณะปรากฏของผลิตผลให้ใกล้เคียงธรรมชาติ และยังช่วยยืดอายุการวางจำหน่ายและเพิ่มความปลอดภัยอาหารได้อีกด้วย

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2549 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2548. ถั่วงอก. ระบบข้อมูลผักมหาวิทยาลัยแม่โจ้ สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. _http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/sprout.pdf

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. Avilable source: http://www.fda.gov

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. 18:548-553.

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