

ผลของโพรไบโอติกในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต Probiotic Inhibition Effects on *Escherichia coli* O157:H7 in Yoghurt

วชิราภรณ์ ทิพย์ศรี (Wachiraporn Tipsorn)* บวรศักดิ์ ลีนานนท์ (Borwonsak Leenanon)**

สิงหนาท พวงจันทร์แดง (Singhanart Phoungchandang)**

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโพรไบโอติก 6 ชนิดได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* IO-1 ในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โซนยับยั้งพบว่า *Lb. acidophilus* และ *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด จากนั้นนำโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาผลการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและการเก็บรักษาโดยใช้จำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL อัตราส่วนระหว่างโพรไบโอติกกับเชื้อโยเกิร์ตเท่ากับ 1:1 พบว่า *Lb. plantarum* มีผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุดโดยระหว่างการเก็บรักษาสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่มีจำนวนเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ และเมื่อนำ *Lb. plantarum* มาศึกษาผลการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดยอัตราส่วนระหว่าง *Lb. plantarum* และเชื้อโยเกิร์ตแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 2:1, 1:1 และ 1:2 พบว่าแต่ละอัตราส่วนมีผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อนำ *Lb. plantarum* มาศึกษาผลการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 กรณีมีการปนเปื้อนก่อนและหลังการหมักโดยเปรียบเทียบ D-value ในช่วงการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นเท่ากันเมื่อเติม *E. coli* O157:H7 ลงในโยเกิร์ตก่อนการหมักจะมี D-value น้อยกว่าตัวอย่างที่เติม *E. coli* O157:H7 หลังการหมัก โดยสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ซึ่งเติมลงในตัวอย่างก่อนการหมักจำนวนเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และมี D-value เท่ากับ 14.65, 14.77 และ 14.88 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่เติม *E. coli* O157:H7 หลังการหมักพบว่าสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีจำนวนเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 72, 72 และ 120 ชั่วโมง และมี D-value เท่ากับ 20.35, 18.95 และ 32.79 ชั่วโมงตามลำดับ

* มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สาขาสถาปัตยกรรมบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ABSTRACT

Inhibition effects of six strains of probiotics including *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, and *Lc. lactis* IO-1 on *Escherichia coli* O157:H7 were studied. According to percentage comparison of inhibition zone, *Lb. acidophilus* and *Lb. plantarum* were found to inhibit *E. coli* O157:H7 the most. Then, both types of probiotics were evaluated for inhibition effect on *E. coli* O157:H7 in yogurt product during fermentation and storage with three different initial concentrations of 2, 4 and 6 log cfu/mL and the ratio of probiotic to yogurt starter as 1:1. It was found that *Lb. plantarum* can inhibit *E. coli* O157:H7 the most as it could reduce the *E. coli* O157:H7 initial count of 2, 4 and 6 log cfu/mL during storage until it could not be detected within 24, 48 and 72 hrs respectively. When studying the inhibition effect of *Lb. plantarum* on *E. coli* O157:H7 at the three different *Lb. plantarum* / yogurt culture ratios of 2:1, 1:1 and 1:2, it was found that there were not significant differences in all ratios ($P>0.05$); however, in case of pre-and post-fermentation contamination with D-value comparison during storage, it was found that samples with the same initial cell concentration of *E. coli* O157:H7 had less D-value with pre-fermentation than with post-fermentation as during storage it could reduce *E. coli* O157:H7 with pre-fermentation artificial contamination at 2, 4 and 6 log cfu/mL until they could not be detected within 24, 48 and 72 hrs with D-values of 14.65, 14.77 and 14.88 hrs respectively while samples with *E. coli* O157:H7 inoculation at 2, 4 and 6 log cfu/mL after fermentation reduced in numbers of *E. coli* O157:H7 until they could not be detected within 72, 72 and 120 hrs with D-values of 20.35, 18.95 and 32.79 hrs respectively.

คำสำคัญ : โพรไบโอติก โยเกิร์ต *Escherichia coli* O157:H7

Key Words : Probiotic, Yoghurt, *Escherichia coli* O157:H7

บทนำ

จุลินทรีย์ในอาหารมีหลายชนิด ทั้งที่ทำให้ อาหารเสื่อมเสีย จุลินทรีย์ก่อโรค และที่ให้ประโยชน์แก่ ร่างกาย ในการแปรรูปอาหาร จำเป็นต้องควบคุม จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการไม่ให้เจริญ และส่งผลเสียต่อ อาหารหรือต่อผู้บริโภค

การควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารมีหลายวิธี เช่น ใช้ความร้อน ความดัน การแช่เยือกแข็ง การควบคุม สภาพของอาหาร รวมทั้งการใช้สารเคมี เป็นต้น ซึ่ง สารเคมีบางชนิดแม้จะได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ แต่อาจมี การสะสม และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ในปัจจุบันรัฐบาลมีนโยบายในการยกระดับ อาหารไทยสู่อาหารโลก มีการนำหลักการอาหารคุณภาพ ดีและปลอดภัยมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร เพื่อให้ มีคุณภาพดีพอสำหรับส่งออกจำหน่ายทั่วโลกได้ โดย อาหารต้องปราศจากสิ่งเจือปน ทั้งทางกายภาพ จุลินทรีย์

เคมี รวมทั้งสารพิษอื่นๆ ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ บริโภค การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีการทางชีวภาพ จึง เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ต้องปรับนโยบายดังกล่าว โดยเป็นการ ใช้สารจากธรรมชาติหรือจุลินทรีย์บางชนิด แทนการใช้ สารเคมี โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ต้องไม่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย และไม่ก่อโรค ได้แก่ จุลินทรีย์พวกโพรไบโอติก ซึ่งมีการ ศึกษาในอาหารหลายชนิด และศึกษาร่วมกับเทคโนโลยี อื่นด้วย เช่น ใช้ร่วมกับการแช่เย็น เพื่อยืดอายุการเก็บ รักษาปลารมควัน (Duffes, 1999) ใช้ร่วมกับเชื้อเริ่มต้น ในการ ผลิตโยเกิร์ต (Kasimoglu and Akgun, 2004) และการผลิตเนยแข็ง (O'Sullivan et al., 2002) หรือ ใช้ร่วมกับการบรรจุแบบสุญญากาศ ในผลิตภัณฑ์เนื้อ สัตว์ (Aymerich et al., 2002) เป็นต้น

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และให้ ประโยชน์แก่ร่างกาย เมื่อบริโภคเข้าไปจะช่วยปรับ สมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ ผลิตสารอาหารที่มีประโยชน์

ช่วยย่อยอาหาร ยับยั้งการผลิตสารก่อมะเร็ง รวมทั้งลดคอเลสเตอรอลได้ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกมีทั้งแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) กลุ่มยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pintolopesii* และรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* เป็นต้น (วิเชียร, 2541) มีการศึกษาพบว่าโปรไบโอติกโดยเฉพาะกลุ่ม LAB สามารถใช้ควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารได้เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มักใช้ผลิตอาหารอยู่แล้วและเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe : GRAS) โปรไบโอติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้เนื่องจาก การแย่งสารอาหารกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้สารอาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอ จุลินทรีย์ที่เจริญช้ากว่าก็จะถูกยับยั้งไปในที่สุด LAB ยังไปเปลี่ยนแปลงสภาพ แวตล่อมในอาหารจากสารเมแทบอไลต์ที่ผลิตขึ้น ทำให้ไม่เหมาะในการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิดอื่น และถูกยับยั้งไป เช่น ลดความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากการผลิตกรดอินทรีย์หรือลดค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (Eh) จากการผลิตสารคาร์บอน ไดออกไซด์ และสารที่ผลิตขึ้นยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ ไดอะเซทิล ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ริวทรีน และแบคทีริโอซินส์ เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป (วิเชียร, 2542; สุมณฑา 2545; พงศ์เทพ, 2546; Klaenhammer, 2001)

โยเกิร์ต เป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากเชื่อกันว่า จุลินทรีย์ในโยเกิร์ตช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดี จุลินทรีย์ที่ใช้หมักโยเกิร์ตได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* หมักโดยใช้นมพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งยังมีจุลินทรีย์เหลือรอด อยู่บ้าง แต่ก็จะถูกยับยั้งไปในระหว่างการหมัก แต่ถ้าหากกระบวนการผลิตไม่ดีพอ เชื้ออาจเหลือรอดหรือปนเปื้อนภายหลังได้ ซึ่งหากเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคอาจส่งผลร้ายแรงต่อผู้บริโภคได้ จุลินทรีย์ก่อโรคอาจเหลือรอดหลังการพาสเจอร์ไรซ์ หรือปนเปื้อนหลังการหมัก ระหว่าง

การผสม แต่งกลิ่นรส หรือบรรจุ ปกติจุลินทรีย์ก่อโรคมักไม่เจริญในโยเกิร์ต แต่สามารถมีชีวิตอยู่ในโยเกิร์ตได้หลายวัน โยเกิร์ตจึงสามารถเป็นพาหะนำเชื้อมาสู่ผู้บริโภคได้ (พวงพร, 2542)

Escherichia coli O157:H7 เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดหนึ่ง จัดเป็น Enterohemorrhagic *E. coli* หรือ EHEC ผลิตสารพิษ verotoxin มีผลทำให้เกิดอาการเลือดออกในลำไส้ (Hemorrhagic colitis : HC) อาการปัสสาวะเป็นเลือด เกิดโลหิตจางเฉียบพลันและอาจไตวายได้ (Hemolytic uremic syndrome : HUS) (ปัทมา และ นงลักษณ์, 2543) เชื้อชนิดนี้ปกติไม่ทนความร้อน แต่อาจเหลือรอดจากการพาสเจอร์ไรซ์ได้หากกระบวนการผลิตไม่มีคุณภาพ และนมดิบที่นำมาผลิตมีเชื้อเริ่มต้นสูง ซึ่งในประเทศไทยยังมีฟาร์มโคนมที่ไม่ได้มาตรฐานอยู่จำนวนมาก จึงมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ และอาจมีการปนเปื้อนหลังการหมักด้วย

Leyer et al. (1995) พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาวะกรด จึงเป็นไปได้ที่จะเหลือรอดในโยเกิร์ตซึ่งมีสภาวะเป็นกรด

Morgan et al. (1993) รายงานว่าการบริโภคโยเกิร์ตที่มีเชื้อ *E. coli* O157:H7 อยู่ด้วยสามารถทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยได้ แม้จะได้รับเชื้อเพียง 10-100 เซลล์ (Garbutt, 1997)

การนำโปรไบโอติกมาใช้ เพื่อควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายแล้ว ยังเป็นการลดความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์แก่ผู้บริโภคด้วย

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในโยเกิร์ต และศึกษาผลการยับยั้งเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน รวมทั้งศึกษาผลการยับยั้ง เมื่อมีการปนเปื้อนในโยเกิร์ตก่อนและหลังการหมัก

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์

Lactobacillus acidophilus TISTR No. 450, *Lb. casei* TISTR No. 390, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* TISTR No. 785, *Lb. plantarum* TISTR No. 050, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR No. 58 (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) *Lc. lactis* IO-1 (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น) *E. coli* O157:H7 strain PN 41 (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

เชื้อเริ่มต้นสำหรับผลิตโยเกิร์ต (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus*) CH-1-Yo-Flex ? ของ Chr. Hansen, Australia.

2. การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 (Gagnon et al., 2004)

เพาะเลี้ยงโปรไบโอติกใน MRS broth บ่ม 37 °ซ 24 ชั่วโมง หยดลงบน MRS agar plate บ่ม 37 °ซ 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน

ถ่าย *E. coli* O157:H7 ลงใน TSB บ่ม 37 °ซ 24 ชั่วโมง เจือจางใน TSA จนได้จำนวน 6 log cfu/mL เทห์ลงบน MRS agar plate ที่มีโปรไบโอติกเจริญอยู่ บ่ม 37 °ซ 18 ชั่วโมง วัดพื้นที่โซนยับยั้งที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์โซนยับยั้ง *E. coli* O157:H7 จาก

$$\frac{\text{พื้นที่โซนยับยั้งทั้งหมด} - \text{พื้นที่หยดโปรไบโอติก} \times 100}{\text{พื้นที่โซนยับยั้งทั้งหมด}}$$

3. การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตเมื่อจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน

เติมเชื้อโยเกิร์ตลงในนํ้านมพาสเจอร์ไรซ์ 4% (v/v) เติมโปรไบโอติกลงไปผสมในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อเชื้อโยเกิร์ต 1:1

เติม *E. coli* O157:H7 ลงในส่วนผสมของโยเกิร์ต 2, 4, และ 6 log cfu/mL บ่ม 43 °ซ 6 ชั่วโมง ทำให้เย็นและเก็บรักษาที่ 4 °ซ แล้วศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตในช่วงการหมักที่ 0, 2, 4, 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0, 24, 48, 72 โดยติดตามจำนวน *E. coli* O157:H7 (SMAC) จำนวนโปรไบโอติก (Sorbitol MRS Agar) จำนวนเชื้อโยเกิร์ต (MRS agar) ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดในรูปของกรดแล็กติก (AOAC, 2000)

4. การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตเมื่ออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติก และเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน

เติม *E. coli* O157:H7 ลงในนมพาสเจอร์ไรซ์จำนวน 2, 4, และ 6 log cfu/mL เติมโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตลงในนมพาสเจอร์ไรซ์ที่มีเชื้อ *E. coli* O157:H7 แต่ละระดับ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ต 3 ระดับคือ 2:1, 1:1 และ 1:2

ศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตในช่วงการหมักที่ 0, 2, 4, 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0, 24, 48, 72 โดยติดตามจำนวน *E. coli* O157:H7 จำนวนโปรไบโอติก จำนวนเชื้อโยเกิร์ต ความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด

5. การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ปนเปื้อนก่อนหรือหลังการหมัก

นำอัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติก และเชื้อโยเกิร์ตที่เหมาะสมมาศึกษาต่อโดยเติม *E. coli* O157:H7 จำนวน 2, 4 และ 6 log cfu/mL ลงในนมพาสเจอร์ไรซ์ก่อนหรือหลังการหมักโยเกิร์ต 3 ระดับ เช่นเดียวกับข้อ 3 และ 4 แล้วเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตในช่วงการหมักที่ 0, 2, 4, 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0, 24, 48, 72 โดยติดตามจำนวน *E. coli* O157:H7 คำนวณ D-value จำนวนโปรไบโอติก จำนวนเชื้อโยเกิร์ต ความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด

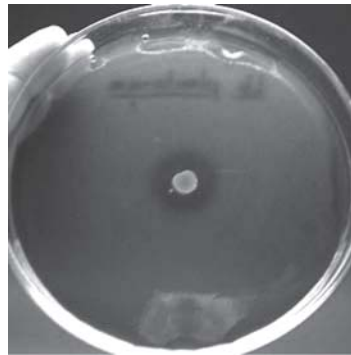
ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7

จากการทดลองพบว่า โปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ จากการสังเกตโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นดังภาพที่ 1 ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกับรายงานของ Mossel et al. (1995) ซึ่งกล่าวว่า *Lactobacillus* และ

Lactococcus สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ โดยโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีผลยับยั้ง *E. coli* O157:H7 แตกต่างกันไป

จากตารางที่ 1 พบว่า *Lb. acidophilus* และ *Lb. plantarum* แสดงเปอร์เซ็นต์โซนยับยั้งสูงสุดและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่าเท่ากับ 67.14 และ 64.10 % ตามลำดับ ($P>0.05$)



ภาพที่ 1 โซนยับยั้งที่เกิดรอบหยดของ *Lb. plantarum*

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นตโซนยับยั้ง *E. coli* O157:H7 จากการใช้โปรไบโอติกแต่ละชนิด

ชนิดของโปรไบโอติก	เปอร์เซ็นตโซนยับยั้ง
ตัวอย่างควบคุม	00.00 ^a ± 00.00
<i>Lb. acidophilus</i>	67.14 ^c ± 05.82
<i>Lb. casei</i>	58.30 ^d ± 07.02
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	00.81 ^a ± 03.71
<i>Lb. plantarum</i>	64.10 ^c ± 06.78
<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	38.17 ^b ± 11.16
<i>Lc. Lactis</i> IO-1	45.35 ^c ± 08.70

a, b,.....ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2. การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตเมื่อจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน

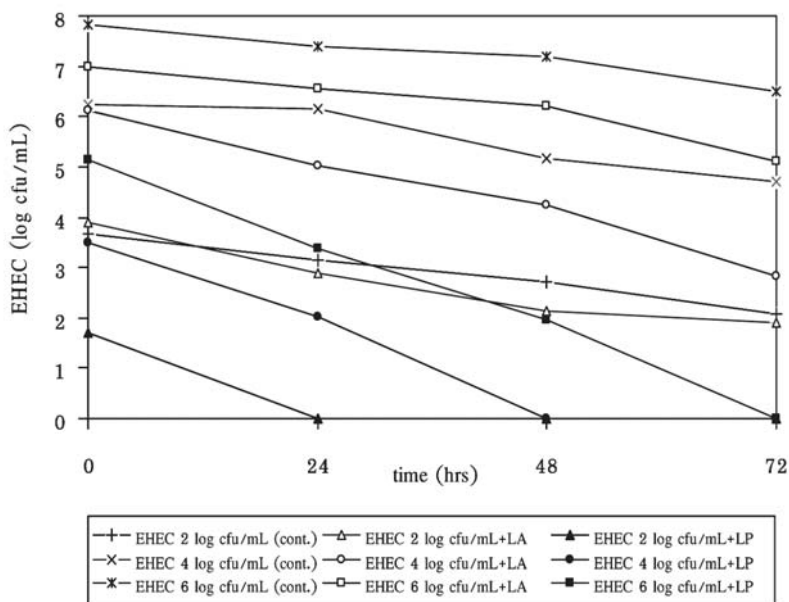
จากผลการทดลองพบว่า โปรไบโอติก

สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ได้ ดังภาพที่ 2 โดย *Lb. plantarum* สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 2, 4

และ 6 log cfu/mL ตามลำดับซึ่งให้ผลในการยับยั้งที่ดีกว่า *Lb. acidophilus* ที่สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ได้แต่ไม่สามารถลดจนถึงขั้นตรวจไม่พบภายใน 72 ชั่วโมง โดยมี *E. coli* O157:H7 เหลือรอด 2.13, 4.25 และ 6.21 log cfu/mL ในตัวอย่างที่มี *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL ขณะที่รายงานของ Kasimonglu and Akgun (2004) พบว่าโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของ *Lb. acidophilus* จะสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงจากเริ่มต้น 2 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 3 ชั่วโมงระหว่างการหมัก และในตัวอย่างที่มี *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 4 และ 6 log cfu/mL จะสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 48 ชั่วโมง แสดงว่าการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ของ *Lb. acidophilus* ในรายงานของ Kasimonglu and Akgun (2004) ดีกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของ

สายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 ที่นำมาใช้โดยในการทดลองนี้เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อหมูในประเทศไทย ซึ่งสายพันธุ์นี้อาจมีความทนทานสภาวะต่างๆ ได้ดีกว่า

ในส่วนของ *Lb. plantarum* ยังไม่พบรายงานการศึกษาในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยตรง แต่ก็มีการศึกษาพบว่า *Lb. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ในระบบขั้วถ่ายของแกะได้ เมื่อใช้ร่วมกับ *Lactobacillus* ชนิดอื่น (Timmerman et al., 2004) และจากรายงานของ Fooks and Gibson (2003) พบว่าการใช้ *Lb. plantarum* ร่วมกับ oligofructose สามารถลดจำนวน *E. coli* และ *Campylobacter jejuni* ได้ ซึ่งการที่ *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้อาจเนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ การผลิตแบคทีเรียโอซินส์ซึ่งอาจเป็น Plantaricin (Muriana, 1996) และการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Ray, 1992) เป็นต้น



ภาพที่ 2 จำนวน *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้โปรไบโอติกแต่ละชนิดระหว่างเก็บรักษาเมื่อจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน

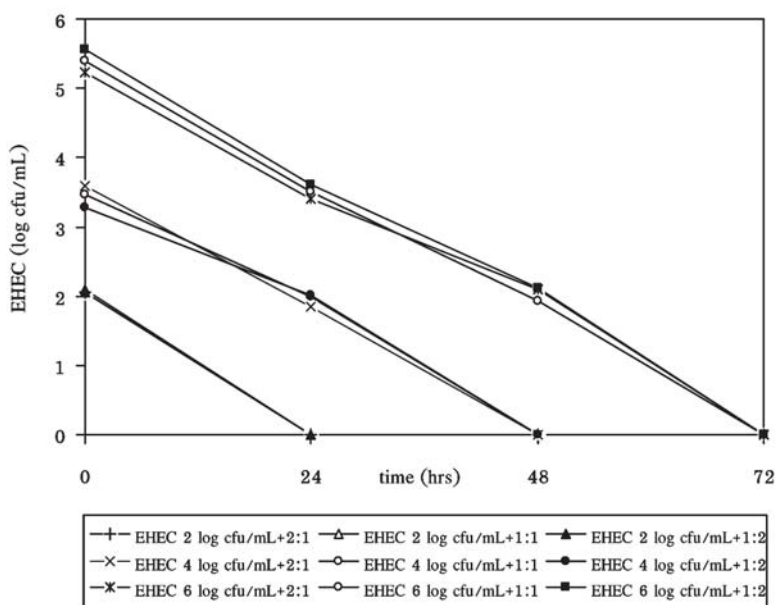
ส่วนโปรไบโอติกจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดโดย *Lb. acidophilus* มีจำนวนประมาณ 9 log cfu/mL ส่วน *Lb. plantarum* มีประมาณ 8 log cfu/mL

และมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในระหว่างเก็บรักษาสำหรับเชื้อโยเกิร์ตพบว่าตัวอย่างที่ใช้และไม่ใช้โปรไบโอติกมีจำนวนไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยมีจำนวน

ประมาณ 7.5–8.0 log cfu/mL ขณะที่ ความเป็นกรด-ต่างในตัวอย่างที่มีโปรไบโอติกอยู่ด้วย จะมีค่าต่ำกว่า ตัวอย่างควบคุม เช่นตัวอย่างที่ใช้ *Lb. acidophilus* มี ความเป็นกรด-ต่างในช่วง 4.0–4.5 ส่วนตัวอย่างที่ใช้ *Lb. plantarum* มีความเป็นกรด-ต่างในช่วง 4.0–4.2 ขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีค่าความเป็นกรด-ต่างในช่วง 4.3–4.8 และตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นสูง ความเป็นกรด-ต่างจะมีแนวโน้มต่ำกว่าตัวอย่างที่มี *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่ำ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดพบว่าตัวอย่างที่ใช้ *Lb. plantarum* จะมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดสูงกว่าตัวอย่างอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 0.84–0.88 ขณะที่ตัวอย่างที่ใช้ *Lb. acidophilus* มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดเท่ากับ 0.81–0.85 นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 6 log cfu/mL จะมีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีจำนวนเริ่มต้น 2 และ 4 log cfu/mL

3. การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตเมื่ออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติก และเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน

จากการทดลองพบว่า การใช้อัตราส่วนที่ต่างกันระหว่าง *Lb. plantarum* กับเชื้อโยเกิร์ตนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ของ *Lb. plantarum* ($P>0.05$) ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Kasimonglu and Akgun (2004) ที่ได้ศึกษาพบว่า การใช้อัตราส่วนระหว่างเชื้อโยเกิร์ตกับ *Lb. acidophilus* ในอัตราส่วน 1:1 และ 2:1 นั้นไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ของ *Lb. acidophilus* โดยอาจเนื่องมาจากการเจริญของโปรไบโอติก ซึ่งแม้จะมีจำนวนเริ่มต้นที่ต่างกัน แต่มีปริมาณอาหารที่ใกล้เคียงกัน ก็สามารถเจริญจนมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน และแสดงความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ไม่ต่างกัน



ภาพที่ 3 จำนวน *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาเมื่ออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติก และเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน

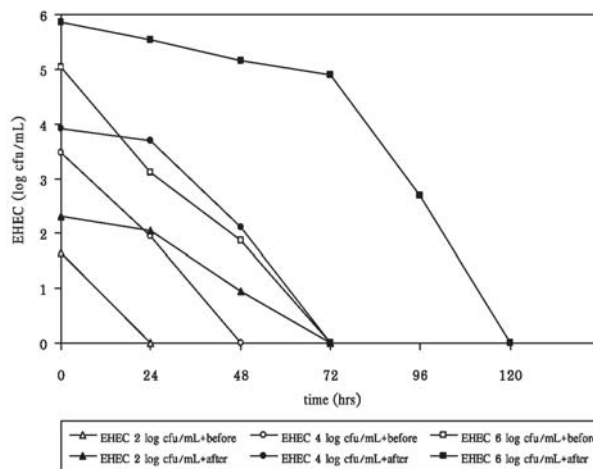
4. การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ปนเปื้อนก่อนและหลังการหมัก

จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เติมเชื้อ *E. coli* O157:H7 ลงในตัวอย่างก่อนการหมักจะมี D-value น้อยกว่าตัวอย่างที่เติมหลังการหมักในตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นเท่ากันดังตารางที่ 2 แสดงว่าเชื้อที่ปนเปื้อนก่อนการหมักจะถูกยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อที่ปนเปื้อนหลังการหมัก ซึ่งอาจเนื่องจาก *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านการหมักมาแล้วจะมีความอ่อนแอลงเมื่อนำมาเก็บรักษาจึงมีการลดลงของเชื้อเร็วกว่าเชื้อในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการหมักมาก่อนซึ่งเชื้อยังแข็งแรงอยู่

จากภาพที่ 4 และตารางที่ 2 พบว่า *Lb. plantarum* สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนในโยเกิร์ตก่อนการหมักที่จำนวนเริ่มต้น 2, 4 และ

6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และมี D-value เท่ากับ 14.65, 14.77 และ 14.88 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนในโยเกิร์ตที่เติม *E. coli* O157:H7 ลงไปหลังการหมักจำนวน 2, 4 และ 6 log cfu/mL เชื้อจะถูกลดจำนวนจนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 72, 72 และ 120 ชั่วโมงและมี D-value เท่ากับ 20.35, 18.95 และ 32.79 ชั่วโมงตามลำดับ

จำนวน *Lb. plantarum* ในแต่ละตัวอย่างพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าประมาณ 8-9 log cfu/mL และจำนวนเชื้อโยเกิร์ตก็ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน ($P>0.05$) โดยมีจำนวนประมาณ 7.5-8.0 log cfu/mL ส่วนความเป็นกรด-ด่างมีค่าประมาณ 3.9-4.0 และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดมีค่าประมาณ 0.8-1.0



ภาพที่ 4 จำนวน *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างเก็บรักษาที่ปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ก่อนและหลังการหมัก

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า D-value ของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาที่ปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ก่อนและหลังการหมัก (ชั่วโมง)

ช่วงของการปนเปื้อน <i>E. coli</i> O157:H7	จำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 เริ่มต้น (log cfu/ml)		
	2	4	6
ก่อนการหมัก	14.65a + 0.33	14.77a + 0.16	14.88a + 0.33
หลังการหมัก	20.35c + 0.82	18.95b + 0.16	32.79d + 0.33

a, b,....ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุป

จากการศึกษาผลของโปรไบโอติก 6 ชนิด ในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 พบว่า *Lb. plantarum* เป็นโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตได้ดีที่สุด และการใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตต่างกันไม่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดย *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนก่อนการหมักได้ดีกว่าปนเปื้อนหลังการหมัก

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโยเกิร์ตระดับอุตสาหกรรมได้ โดยอาจมีการปรับปรุงคุณภาพด้านอื่นควบคู่ไปด้วย ตามความเหมาะสม นอกจากนี้ ยังสามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นได้เช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ปัทมา แดงชาติ, นงลักษณ์ พิสุทธิลาภ. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ในอาหารทะเลแช่แข็งที่ผลิตเพื่อการส่งออก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 43(3): 262-8.

พวงพร โชติไกร. 2542. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

พงศ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอชินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. อาหาร 2546; 33(3): 173-80.

วิเชียร สิลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ ตอนที่ 1. วารสารจารย์ 5(41): 50-3.

วิเชียร สิลาวัชรมาศ. 2542. โปรไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ ตอนจบ. วารสารจารย์ 6(49): 31-5.

สมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

AOAC. 1999. Official Methods of Analysis Association Official Analytical Chemists. 16th ed. Maryland.

Aymerich MT, Garriga M, Costa S, Monfort JM, Hugas M. 2002. Preservation of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. International Dairy Journal 12: 239-46.

Duffes F, Leori F, Boyaval P, Dousset X. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium spp.* Strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 °C. International Journal of Food Microbiology 47: 33-42.

Fooks LJ, Gibson GR. 2003. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Anaerobe 9: 231-42.

Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. International Journal of Food Microbiology 92: 69-78.

Garbutt J. Essentials of Food Microbiology. 1997. London: Arnold.

Kasimoglu A, Akgun S. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the Processing and Post-Processing Stages of Acidophilus Yoghurt. International Journal of Food Science & Technology 39: 563-8.

Klaenhammer TR. 2001. Probiotics and Prebiotics. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food Microbiological. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press. p. 797-811.

- Leyer GL, Wang L, Johnson EA. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increase survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3752-55.
- Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection* 111(2): 181-7.
- Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB, Baird RM. 1995. *Essentials of the Microbiology of Foods*. England: John Wiley & Sons.
- Muriana PM. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection* 59: 54-63. อ้างถึงใน พงศเทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. *อาหาร* 33(3): 173-80.
- O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. *Biochimie* 84: 593-624.
- Ray B. 1992. Cells of Lactic Acid Bacteria as Food Biopreservatives. In: Ray B, Daeschel M, editors. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Florida: CRC Press. p. 81-101.
- Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. 2004. Monostrain and multispecies Probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* In Press.