Agricultural Sci. J. 37 : 5 (Suppl.) : 345-348 (2006) ว. วิทย. กษ. 37 : 5 (พิเศษ) : 345-348 (2549)

ผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต

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

วชิราภรณ์ ทิพย์ศร[1] บวรศักดิ์ ลีนานนท์[1] และ สิงหนาท พวงจันทน์แดง[1]

Wachiraporn Tipsorn[1], Borwonsak Leenanon[1] and [1]Singhanart Phoungchandang[1]

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.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของโปรไบโอติก 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 และจากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โซนยับยั้งพบว่า *Lb. acidophilus* และ *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด จากนั้นนำโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและการเก็บรักษาโดยใช้จำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกกับเชื้อโยเกิร์ตเท่ากับ 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 เมื่อนำ *Lb. plantarum* มาศึกษาผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในอัตราส่วนระหว่าง *Lb. plantarum* และเชื้อโยเกิร์ตที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 2:1, 1:1 และ 1:2 พบว่าแต่ละอัตราส่วนมีผลในการยับยั้ง E. coli O157:H7 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) อย่างไรก็ตามเมื่อนำ *Lb. plantarum* มาศึกษาผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 เมื่อมีการปนเปื้อนก่อนและหลังการหมักโดยเปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการตาย (D-value) ในช่วงการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นเท่ากันเมื่อเติม *E. coli* O157:H7 ลงในโยเกิร์ตก่อนการหมักจะมีค่า D-value น้อยกว่าตัวอย่างที่เติม *E. coli* O157:H7 หลังการหมัก โดยสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ซึ่งเติมลงในตัวอย่างก่อนการหมักที่จำนวนเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และมีค่า 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 และมีค่า D-value เท่ากับ 20.35, 18.95 และ 32.79 ชั่วโมงตามลำดับ

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

[1] Department of Food Technology, Faculty of Technology, Khon kaen University 40002

คำนำ

การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีวภาพเป็นการใช้สารจากธรรมชาติหรือจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในอาหารแทนการใช้สารเคมี ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาในอาหารหลายชนิด เช่น ปลารมควัน (Duffes, 1999) โยเกิร์ต (Kasımoglu and Akgün, 2004) เนยแข็ง (O'Sullivan et al., 2002) และเนื้อสัตว์ (Aymerich et al., 2002) เป็นต้น

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและให้ประโยชน์แก่ร่างกาย มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541) และเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded As Safe : GRAS) มีการศึกษาพบว่าโปรไบโอติกสามารถควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารได้จากการแย่งสารอาหารกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในอาหาร และการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์ 2545)

การผลิตโยเกิร์ตปกติจะหมักโดยใช้นมพาสเจอไรซ์ ซึ่งยังมีจุลินทรีย์เหลือรอดบ้าง แต่จะถูกยับยั้งระหว่างการหมัก แต่หากกระบวนการผลิตไม่ดีพอ อาจเหลือรอดหรือปนเปื้อนภายหลังได้ จุลินทรีย์ที่ก่อโรคบางชนิด สามารถมีชีวิตอยู่ในโยเกิร์ตได้หลายวัน โยเกิร์ตจึงเป็นพาหะนำเชื้อมาสู่ผู้บริโภคได้ (พวงพร โชติไกร, 2542)

Escherichia coli O157:H7 เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดหนึ่งที่พบว่าสามารถเหลือรอดในโยเกิร์ตได้หลายวัน และสามารถผลิตสารพิษ verotoxin ทำให้เกิดเลือดออกในลำไส้ มีอาการปัสสาวะเป็นเลือด เกิดโลหิตจางเฉียบพลันและอาจไตวายได้ (ปัทมา แดงชาติ และ นงลักษณ์ พิสุทธิลาภ, 2543) เชื้อชนิดนี้อาจเหลือรอดจากการพาสเจอไรซ์ได้หากกระบวนการผลิตไม่ได้คุณภาพ และนมดิบมีเชื้อเริ่มต้นสูง และอาจมีการปนเปื้อนหลังการหมักด้วย Leyer et al. (1995) พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาวะกรด จึงเป็นไปได้ที่จะเหลือรอดในโยเกิร์ตซึ่งมีสภาวะเป็นกรด และ Morgan et al. (1993) รายงานว่าการบริโภคโยเกิร์ตที่มี *E. coli* O157:H7 สามารถทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยได้ แม้จะได้รับเชื้อเพียง 10-100 เซลล์ (Garbutt, 1997) การนำโปรไบโอติกมาใช้ควบคุมเชื้อดังกล่าวในอาหาร นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายแล้วยังเป็นการลดความเสี่ยง ด้านจุลินทรีย์แก่ผู้บริโภคด้วย

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในโยเกิร์ต และศึกษาผลการยับยั้งเมื่ออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน รวมทั้งผลการยับยั้งเมื่อมีการปนเปื้อนก่อนและหลังการหมัก

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

เตรียมโปรไบโอติกแต่ละชนิด (*Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. plantarum,* และ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Lc. lactis* IO-1 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ใน MRS broth (Pronadisa, Spain) *E. coli* O157:H7 (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) เตรียมใน TSB (Himedia, India) จุลินทรีย์ทุกชนิดข้างต้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อเริ่มต้นโยเกิร์ต (CH-1-Yoflex®, Chr.Hansen) เตรียมในนม UHT บ่มที่ 43 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ศึกษาผลการยับยั้งโดยทดสอบการเกิดโซนยับยั้ง (Gagnon et al., 2004) จากนั้นคัดเลือกโปรไบโอติกที่เกิดโซนยับยั้งมากที่สุด 2 ชนิดมาศึกษาผลการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตโดยเติมโปรไบโอติกพร้อมกับเชื้อโยเกิร์ต ลงในส่วนผสมที่มี *E. coli* O157:H7 เจือจางอยู่ 2, 4 และ 6 log cfu/mL ติดตามจำนวน *E. coli* O157:H7 (SMAC : Himedia, India) ที่เหลือรอดระหว่างการหมักทุก 2 ชั่วโมงและระหว่างเก็บรักษาทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโปรไบโอติกที่ยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุดมาศึกษาผลการยับยั้งเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน คัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมมาศึกษาผลการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 เมื่อมีการปนเปื้อนก่อนและหลังการหมัก โดยการเติม *E. coli* O157:H7 ลงในโยเกิร์ตก่อนและหลังการหมัก ติดตามจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่เหลือรอดระหว่างเก็บรักษาทุก 24 ชั่วโมง จนตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต

ผลและวิจารณ์

โปรไบโอติกส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ จากการสังเกตโซนยับยั้งที่เกิดขึ้น โปรไบโอติกแต่ละชนิดมีผลยับยั้ง *E. coli* O157:H7 แตกต่างกันไป โดย *Lb. acidophilus* และ *Lb. plantarum* มีเปอร์เซ็นต์โซนยับยั้งสูงที่สุด (Table 1) เมื่อศึกษาในโยเกิร์ตพบว่า *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด โดยลดจำนวนจนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในตัวอย่างที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL ตามลำดับ

(Figure 1)การยับยั้งดังกล่าวอาจเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ การผลิตแบคเทอริโอซินส์ หรือการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Ray, 1992) เป็นต้น ส่วน *Lb. acidophilus* ไม่สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบได้ภายใน 72 ชั่วโมงขณะที่ Kasımonglu and Akgün (2004) พบว่า *Lb. acidophilus* สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงจากเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 3, 48 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 ที่นำมาใช้ศึกษา

Table 1 Percentage of Inhibition zone from each Probiotics(each number in table represent the average of Percent of Inhibition zone and standard deviation)

Probiotics	Percent of Inhibition zone (%)
Control (no probiotic)	$00.00^{a} \pm 00.00$
Lb. acidophilus	$67.14^{e} \pm 05.82$
Lb. casei	$58.30^{d} \pm 07.02$
Lb. delbrueckii subsp. lactis	$00.81^{a} \pm 03.71$
Lb. plantarum	$64.10^{e} \pm 06.78$
Lc. Lactis subsp. *cremoris*	$38.17^{b} \pm 11.16$
Lc. Lactis IO-1	$45.35^{c} \pm 08.70$

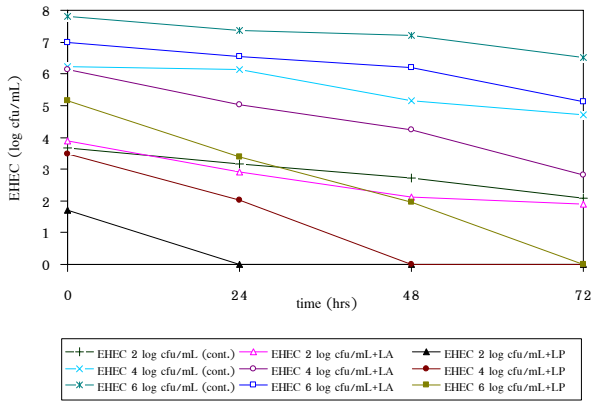

Figure 1 Survival of *E. coli* O157:H7 in both types of probiotic yoghurt during storage at 4°C

ส่วนการใช้ *Lb. plantarum* กับเชื้อโยเกิร์ตในอัตราส่วนที่ต่างกันนั้นพบว่าไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 (P>0.05) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kasımonglu, Akgün (2004) ที่พบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างเชื้อโยเกิร์ตกับ *Lb. acidiphilus* ต่างกันมีผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ไม่ต่างกัน

เมื่อศึกษาผลในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่มีการปนเปื้อนก่อนและหลังการหมักพบว่าตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนก่อนการหมักมีค่า D-value น้อยกว่าตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนหลังการหมักในกรณีที่มีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นเท่ากัน แสดงว่าเชื้อที่มีการปนเปื้อนก่อนการหมักจะถูกยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อที่มีการปนเปื้อนหลังการหมักซึ่งอาจเนื่องจาก *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านการหมักมาแล้วจะมีความอ่อนแอลง เมื่อนำมาเก็บรักษาต่อจึงมีการลดจำนวนลงเร็วกว่า *E. coli* O157:H7 ที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการหมักมาก่อนซึ่งเชื้อยังแข็งแรงอยู่ โดย *Lb. plantarum* สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนในโยเกิร์ตก่อนการหมักที่จำนวนเชื้อเริ่มต้น 2, 4 และ 6 log cfu/mL จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และที่ปนเปื้อนหลังการหมักจนไม่สามารถพบได้ภายใน 72, 72 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ (Figure 2)

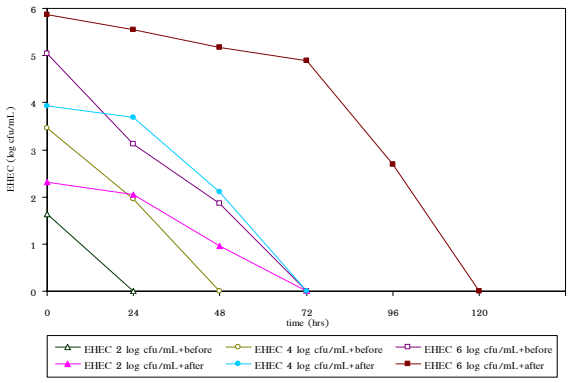

Figure 2 Survival of *E. coli* O157:H7 in both types of artificial contamination yoghurt during storage at 4°C

สรุป

จากการศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 พบว่า *Lb. plantarum* เป็นโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตได้ดีที่สุด และการใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตที่แตกต่างกันนั้นไม่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และพบว่า *Lb. plantarum* สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่มีการปนเปื้อนก่อนการหมักได้ดีกว่าการปนเปื้อนหลังการหมัก ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยต้องปรับปรุงคุณภาพด้านอื่นควบคู่ไปด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ ใช้และศึกษาในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นได้เช่นกัน

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.บวรศักดิ์ ลีนานนท์ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ปรึกษาหลักในการทำวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย และโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

พวงพร โชติไกร. 2542. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 334 น.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ ตอนที่ 1. จาร์พาร์. 5: 50-3.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Aymerich MT, Garriga M, Costa S, Monfort JM, Hugas M. Preservation of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. Int. Dairy J. 2002; 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. Int. J. Food Microbiol. 47: 33-42.

Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I. 2004. Invitro inhibition of Escherichia O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. Int. J. Food Microbiol. 92: 69-78.

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

Kasımoglu A, Akgün S. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the Processing and Post-Processing Stages of Acidophilus Yoghurt. Int. J. Food Sci. & Tech. 39: 563-8.

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: 181-7.

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**. CRC Press. Florida.