วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3(67-75)

ผลของโพรไบโอติกและอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของ *Escherichia coli* 0157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ท

Effect of probiotic and temperature on survival of *Escherichia coli* 0157:H7 during storage of probiotic set yoghurt

อพัชชา จินดาประเสริฐ[1*] สุกัญญา โตมะนิตย์[2] อดิศร เสวตวิวัฒน์[1] และ ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ ABT-5 และ ABY-3 ต่อการอยู่รอดของ *Escherichia coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มที่ 43°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ทที่ 4, 8 และ 15°C พบการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต ส่งผลให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรดด่างลดลงที่ 4.50±0.04 และ 4.55±0.02 ใน ABT-5 และ ABY-3 ตามลำดับ และตรวจพบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ขณะที่การเก็บรักษาโยเกิร์ตตรวจไม่พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตโพรไบโอติก ผลการทดลองพบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABT-5 ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 4°C เป็นเวลา 5 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.30±0.03 ที่ 8 และ 15°C เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.25±0.02 และ 4.29±0.01 ตามลำดับ และโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABY-3 ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ที่ 4 และ 8°C เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.31±0.06 และ 4.31±0.04 ตามลำดับ และที่ 15°C เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.34±0.03 จลนพลศาสตร์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต พบจำนวน *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่เวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เท่ากับ 3.07 และ 4.01 ชั่วโมง ใน ABT-5 และ ABY-3 ตามลำดับ ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในการเก็บรักษาโยเกิร์ต พบว่าอัตราการตายของ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มของอุณหภูมิในการเก็บรักษา ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแบบเซ็ทได้ดีกว่า ABY-3

คำสำคัญ : โพรไบโอติก *E. coli* O157:H7 โยเกิร์ตแบบเซ็ท จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

Abstract

Effect of two types of commercial probiotics as starter yoghurt ABT-5 and ABY-3 on survival of *Escherichia coli* O157:H7 were investigated during set yoghurt production at 43 ºC for 6 hr and storaged at 4, 8 and 15ºC. It was found that the probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Bf. lactis*, counts increased, which resulted in increasing of acid percentage and decreasing of pH value at pH 4.50±0.04 and 4.55±0.02 in ABT-5 and ABY-3 yoghurt, respectively, and *E. coli* O157:H7 count could be detected during fermentation. However, *E. coli* O157:H7 could not survive during storage of probiotic set yoghurt at 4, 8 and 15ºC. The results showed that, the yoghurt with ABT-5 as starter could not be detected *E. coli* O157: H7 during storage at 4 ºC for 5 days at pH 4.30±0.03. This pathogenic strain could not be detected in the same starters yoghurt after storage time at 8 and 15 ºC for 3 days at pH 4.25±0.02 and 4.29±0.01, respectively. Additionally, the yoghurt with ABY-3 starter could also not detect

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
[2]โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต สวนจิตรลดา เขตดุสิต กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli O157: H7 at 4 and 8ºC for 7 days at pH 4.31±0.06 and 4.31±0.04, respectively, and at 15ºC for 5 days at pH 4.34±0.03. The growth kinetics of *E. coli* O157:H7 revealed that its count increased slightly during yoghurt fermentation with ABT-5 and ABY-3 starters at generation time of 3.07 and 4.01 h, respectively. The effect of temperature on survival of *E. coli* O157:H7 during storing indicated that the storage temperature affected on the *E. coli* O157:H7 survival resulting in increasing of death rate after increase in storage temperature. The results of this study indicated that ABT-5 yoghurt culture was more effective than ABY-3 in growth inhibitory of *E. coli* O157:H7 during storage.

Keywords : Probiotics, *E. coli* O157:H7, Yoghurt, Microbial kinetic parameter

บทนำ

โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมซึ่งผ่านกระบวนการหมัก ทำให้มีรสเปรี้ยว เป็นอาหารสุขภาพเนื่องจากจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตมีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยทำหน้าที่สร้างสมดุลประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ และป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ร่างกายไม่ต้องการเจริญเติบโตในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ จุลินทรีย์ดังกล่าว ได้แก่ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Bylund, 1995) โยเกิร์ตมีทั้งชนิดที่หมักในบรรจุภัณฑ์ (set yoghurt) และชนิดที่หมักแล้วจึงบรรจุลงบรรจุภัณฑ์ (stirred yoghurt) ปกติแล้วในกระบวนการหมักโยเกิร์ต จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจะถูกยับยั้งระหว่างกระบวนการหมัก แต่หากมีการจัดการเกี่ยวกับการผลิตที่ไม่ดี เช่น การปนเปื้อนจากสารปนเปื้อนจากวัตถุดิบ ภาชนะ เครื่องมือ และพนักงาน หรืออาจมีการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้จากการพาสเจอร์ไรส์ และการปนเปื้อนหลังกระบวนการหมัก อาจส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายได้

E. coli O157:H7 เป็น Enterohemorrhagic *E. coli* หรือ EHEC จัดอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เป็นสาเหตุให้เกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบ มีเลือดออก (hemorrhagic colitis) โรคเม็ดเลือดแดงแตกและไตถูกทำลาย (hemolytic ureamic syndrome) โดยทั่วไปเชื้อนี้พบในสัตว์ประเภทให้นม เช่น วัว ควาย และผลิตภัณฑ์ของสัตว์ เช่น นม เนื้อ โดยนมอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในระหว่างการรีดนม และนมดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน การก่อให้เกิดโรคของ *E. coli* O157:H7 เกิดในทุกช่วงอายุ แต่ในเด็กและผู้สูงอายุ พบว่ามีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคและอาการรุนแรงมากกว่า (WHO, 2005) ซึ่งการได้รับเชื้อน้อยกว่า 10 เซลล์สามารถทำให้เกิดโรคได้ (อัจฉรา เพิ่ม, 2549) โดยในปี ค.ศ. 1991 ประเทศอังกฤษพบการระบาดของเชื้อนี้ในผู้ป่วยเด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี มีอาการเม็ดเลือดแดงแตกและไตถูกทำลาย ภายหลังจากการรับประทานโยเกิร์ตที่ผลิตจากนมพาสเจอร์ไรซ์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157 ในระหว่างการผลิต (Morgan *et al.,* 1993) นอกจากนี้ *E. coli* O157:H7 สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนในโยเกิร์ตได้ โดย Massa *et al*. (1997) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 และ 7 Log CFU/ml ในโยเกิร์ตธรรมชาติ และบิฟิโดโยเกิร์ต (bifido yoghurt) หลังจากเก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 7 วัน ต่อมา Bachrouri *et al*. (2002) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 3.6 และ1.6 Log CFU/g ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่ 4 และ 8°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ทางด้านสุขภาพ ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ ช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ ป้องกันโรคท้องร่วง เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Analie and Bennie, 2001) จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* รายงานการศึกษาพบว่าโพรไบโอติกสามารถใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในนมและโยเกิร์ตได้ (วชิราภรณ์ ทิพย์ศร และคณะ, 2549; Glumez and Guven, 2003; Kasimoglu and Akgün, 2004; Batjantsan, 2007; Tsai *et al*., 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกทางการค้าต่อการอยู่รอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแบบเซ็ทที่อุณหภูมิแตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาจลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตแบบเซ็ท

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ต

เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกทางการค้า 2 ชนิด ได้รับจากบริษัท Chr. Hansen ประเทศเดนมาร์ค ได้แก่ ABT-5 ประกอบด้วย *Strep. thermophilus*, *L. acidophillus*, *Bifidobacterium* spp. และ ABY-3 ประกอบด้วย *Strep. Ther-mophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* และ *Bf. lactis*

2. การเตรียมเชื้อ *E. coli* O157:H7

ทำโดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157:H7 (Lot. 12743) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จาก stock culture ลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเชื้อด้วยสารละลายเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาณเชื้อตามต้องการก่อนนำมาใช้ในการศึกษา

3. การศึกษาผลของกล้าเชื้อโพรไบโอติกและอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ท

ทำการผลิตโยเกิร์ต โดยผสมหางนมสดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ จำนวน 1 ลิตร กับหางนมผง 3 เปอร์เซ็นต์ และสเตบิไลเซอร์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ให้ความร้อนที่ 60-65°C เป็นเวลา 25 นาที และพาสเจอร์ไรส์ที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่ 43°C เติมเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ต ABT-5 หรือ ABY-3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเติมเชื้อ *E. coli* O157:H7 ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml บ่มโยเกิร์ตที่ 43°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการเก็บรักษาที่ 4, 8 และ 15°C เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างในระหว่างการบ่ม ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และในระหว่างเก็บรักษาโยเกิร์ต เป็นเวลา 1 3 5 7 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ติดตามการรอดชีวิตของ *E. coli* O157:H7 บนอาหาร Sorbitol MacConkey agar บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mekonnen และ Mogessie, 2005) และการเจริญของแบคทีเรียแลกติค *L. acidophilus* บนอาหาร MRS-IM agar ที่เติมมอลโตส 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bifidobacterium* spp. บนอาหาร MRS-IM agar ที่เติมกลูโคส dichloxallin, lithium chloride และ cysteine hydrochloride 20, 0.05, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 วัน สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic system (Forma Scientific, U.S.A) ตามวิธีการของ Chr. Hansen (2005) จากนั้นนำตัวอย่างโยเกิร์ตมาวิเคราะห์ความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช และเปอร์เซ็นต์แลคติกโดยการไทเตรทด้วย 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (AOAC, 1995)

4. จลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตแบบเซ็ท

ในการศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อ ABT-5 และ ABY-3 สามารถศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มและการเก็บรักษาโยเกิร์ต ได้จากสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) (x) และเวลา (y) ซึ่งจากสมการดังกล่าวสามารถหาความชันของกราฟจากสมการเส้นตรง แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) และอัตราการตายจำเพาะ (specific death rate, μ') จากนั้นนำมาหาคำนวณหาค่าเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, t_g) และเวลาการตาย (death time, t_d) รวมถึงค่าคงที่อัตราการเจริญ (growth rate, k) และอัตราการตาย (death rate, k') ตามวิธีการของ Bachrouri *et al.* (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของกล้าเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตแบบเซ็ท

การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในโยเกิร์ตแบบเซ็ท พบจำนวนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการบ่ม (Figure 1) โดยโยเกิร์ตใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 ปริมาณ *L. acidophilus* เพิ่มจาก 5.69±0.10 เป็น 6.30±0.00 Log CFU/g และ *Bifidobacterium* spp. เพิ่มจาก 5.70± 0.04 เป็น 6.50±0.04 Log CFU/g ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABY-3 จำนวนของ *L. acidophilus* เพิ่มจาก 5.75±0.09 เป็น 6.36±0.01 Log CFU/g และปริมาณของ *Bf. lactis* เพิ่มขึ้น

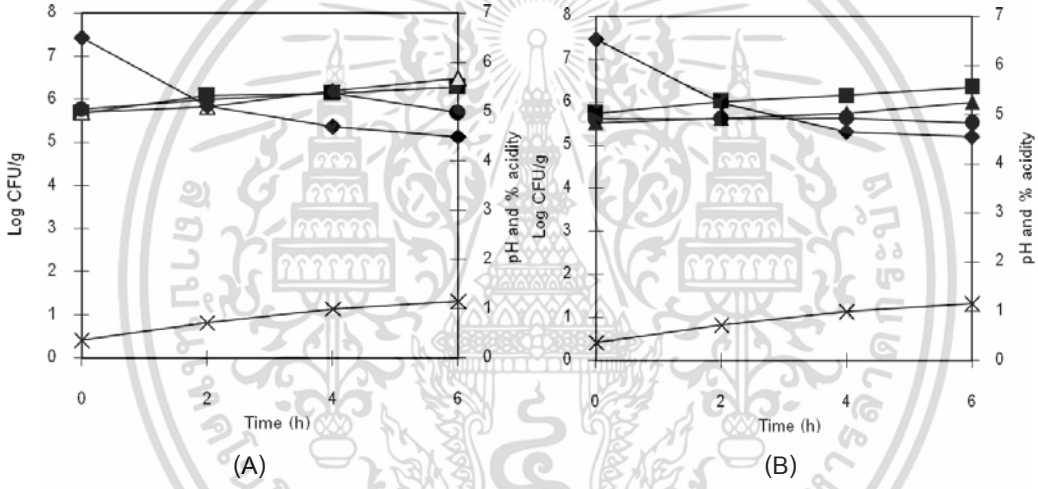

Figure 1 The survival of *E. coli* O157:H7 (●), the growth of *L. acidophillus* (■), *Bifidobacterium* spp. (Δ) and *Bf. lactis* (▲), pH values (♦) and acidity (x) during fermentation with ABT-5 (A) and ABY-3 (B) starters at 43°C for 6 h.

จาก 5.53±0.04 เป็น 6.01±0.09 Log CFU/g ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น และความเป็นกรดด่างของโยเกิร์ตมีแนวโน้มลดลงจาก 6.50±0.07 เป็น 4.50±0.04 ในโยเกิร์ต ABT-5 และ 6.53±0.10 เป็น 4.55±0.02 ใน ABY-3 ตามลำดับ

การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตทั้งสอง พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABT-5 จำนวน *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 5.77±0.02 เป็น 6.15±0.05 Log CFU/g ใน 4 ชั่วโมงแรกของการบ่ม จากนั้นลดจำนวนลงเล็กน้อยเป็น 5.70±0.02 Log CFU/g ส่วน ABY-3 จำนวนเชื้อลดลงจาก 5.61±0.13 เป็น 5.53±0.06 Log CFU/g ตามลำดับ (Figure 1) สอดคล้องกับ Massa *et al.* (1997) รายงานว่าจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 และ 10^7 Log CFU/ml ไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการบ่มโยเกิร์ตที่ 42°C และการศึกษาของ Bachrouri *et al.* (2006) พบจำนวน *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายหลังจากการบ่มโยเกิร์ต การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในช่วงบ่มโยเกิร์ตเป็นผลมาจากความเป็นกรดด่างของโยเกิร์ตเมื่อสิ้นสุดกระบวนการบ่มที่ 4.50±0.04 และ 4.55±0.02 ใน ABT-5 และ ABY-3 ตามลำดับ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ลงได้ สอดคล้องกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ Connor and Kotrola (1995) รายงานว่า *E. coli* O157:H7 อยู่รอดได้ในอาหาร TSB ที่มีการปรับความเป็นกรดด่าง 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เช่นเดียวกับสิริพร สธนเสาวภาคย์ และคณะ (2543) พบว่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 เจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.5-9.5 และ Karagozlu *et al*. (2007) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.6

2. ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ท

ในช่วงเก็บรักษาโยเกิร์ตพบว่าจำนวน *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *L. acidophilus* และ *Bf. lactis* ใน ABY-3 เพิ่มขึ้นในช่วง 5 วันแรก ประมาณ 1-Log cycle จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Figure 2) การลดลงของเชื้อโพรไบโอติกเป็นผลมาจากจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลแลคโตสและออกซิเจนในนมเพื่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติก ทำให้เกิดการขาดแคลนสารอาหาร รวมถึงสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตสารในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ สอดคล้องกับ Lankaputhra and Shah (1994) อธิบายว่าการลดลงของเชื้อโพรไบโอติก มีผลมาจากค่าความเป็นกรดด่าง เปอร์เซ็นต์กรด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาพบว่าจำนวน *L. acidophilus* มากกว่า *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *Bf. lactis* ใน ABY-3 ในทุกสภาวะ นอกจากนี้พบว่า ABT-5 มีปริมาณ *L. acidophilus* มากกว่า ABY-3 ตลอดระยะเวลาในการเก็บโยเกิร์ต เนื่องจากใน ABT-5 ไม่มีส่วนผสมของเชื้อ *L. bulgaricus* ที่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *L. acidophilus* (Analie และ Bennie, 2001) สอดคล้องกับ Dave and Shah (1997) รายงานว่าการหมักโยเกิร์ตที่ประกอบด้วยกล้าเชื้อ *Strep. thermophilus*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. มีจำนวน *L. acidophilus* มากกว่าโยเกิร์ตที่ประกอบด้วย *Strep. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. acidophilus*

อุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บโยเกิร์ตที่ 15°C จำนวน *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *L. acidophilus* และ *Bf. lactis* ใน ABY-3 มากกว่าที่ 8 และ 4°C เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงทำให้โพรไบโอติกเจริญได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15°C เป็นสภาวะใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกสอดคล้องกับ

จารุวรรณ มณีศรี (2550) รายงานว่า *Strep. thermophilus* และ *L. bulgaricus* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) และการทดลองของ Dave and Shah (1997) พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 10°C จำนวน *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. มากกว่าที่ 4°C

3. การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ท

โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 (Figure 2A) จำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลง 3 Log cycle ในช่วง 3 วันแรกที่ 4°C และลดลง 2 Log cycle หลังจากเก็บรักษาที่ 8 และ 15°C เป็นเวลา 1 วัน ตามลำดับ และตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดด่าง 4.30±0.03 และที่อุณหภูมิ 8 และ 15°C เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเป็นกรดด่าง 4.25±0.02 และ 4.29±0.01 ตามลำดับ ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 (Figure 2B) พบว่าจำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลง 3 Log cycle ในช่วง 5 วันแรกที่ 4 และ 8 °C และลดลง 3 Log cycle หลังจากเก็บรักษาที่ 15 °C เป็นเวลา 3 วัน และตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาที่ 4 และ 8°C เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเป็นกรดด่าง 4.31±0.06 และ 4.31±0.04 ตามลำดับ และที่ 15°C เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดด่าง 4.34±0.03 ผลการศึกษาพบว่าการอยู่รอดของ *E. coli* 0157:H7 มีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ ชนิดของจุลินทรีย์โยเกิร์ตทางการค้า รวมทั้งความเป็นกรดด่างในโยเกิร์ต โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABT-5 มีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกโดยเฉพาะ *L. acidophilus* มากกว่า ABY-3 ที่อุณหภูมิเดียวกัน ทำให้ความเป็นกรดด่างในโยเกิร์ตลดลง ส่งผลให้ลดระยะเวลาในการลดจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

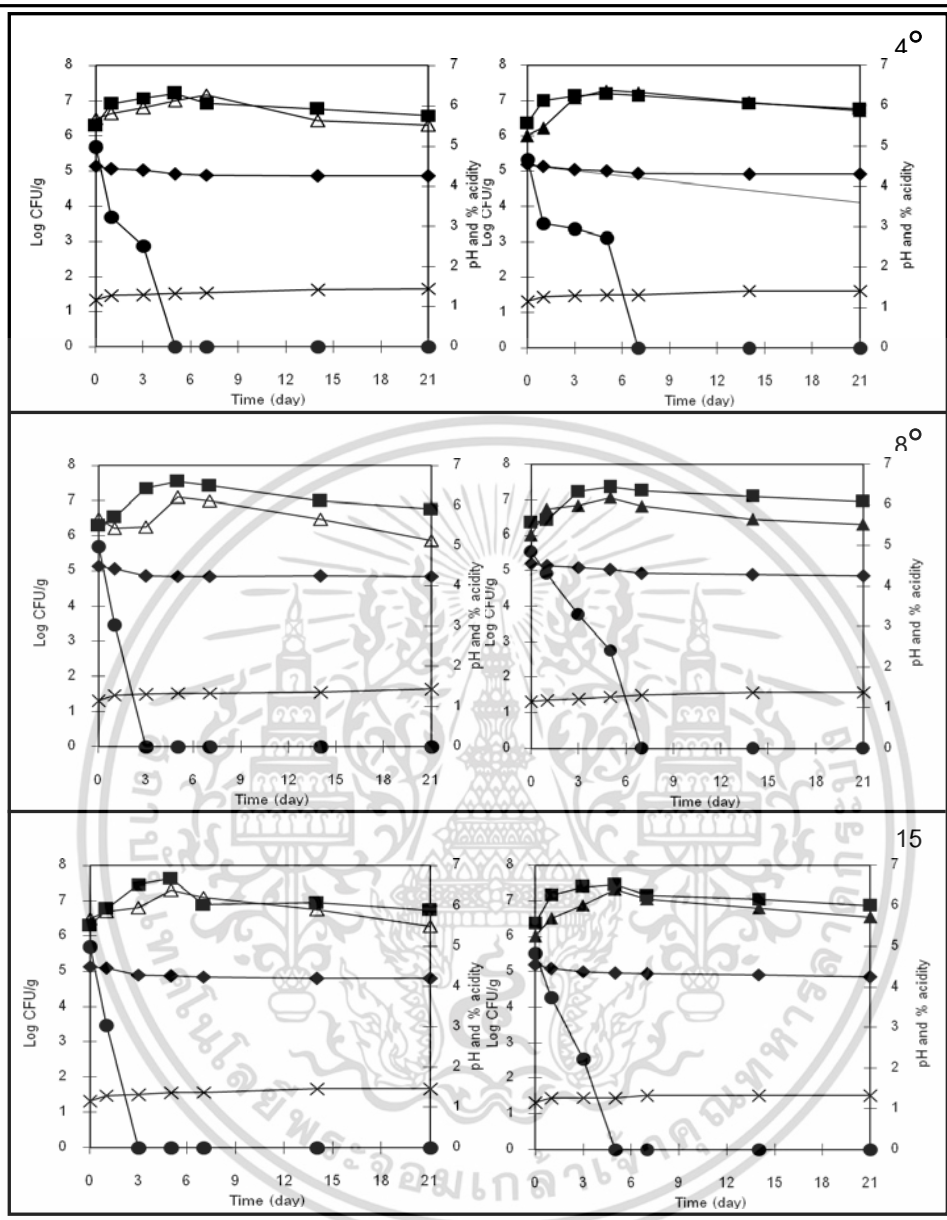

Figure 2 The survival of *E. coli* O157:H7 (●), the growth of *L. acidophillus* (■), *Bifidobacterium* spp. (Δ) and *Bf. lactis* (▲), pH values (♦) and acidity (**x**) in ABT-5 (A) and ABY-3 (B) yoghurts during storage at 4, 8 and 15°C

E. coli O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ นอกจากนี้อุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 โดยการเก็บรักษาโยเกิร์ตชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิสูงเชื้อโพรไบโอติกเจริญได้ดีกว่า ทำให้ความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำกว่า ส่งผลให้ *E. coli* O157:H7 ลดจำนวนเร็วกว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ สอดคล้องกับการตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 เมื่อเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 2 และ 4°C เป็นเวลา 20-21 วัน และที่ 8°C เป็นเวลา 7-8 วัน (Bachouri *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับรายงานของ Batjantsan (2007) พบว่าการเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รักษาโยเกิร์ตแบบพื้นบ้าน ที่ 8°C ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงอย่างรวดเร็ว จนตรวจไม่พบภายในเวลา 13 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.70 เร็วกว่าที่ 4°C ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อในเวลา 22 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.30 การยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต เป็นผลมาจากแบคทีเรียแลคติกสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารลดลง (ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และอดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548) ซึ่งกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัว สามารถผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวและปล่อยโปรตอน ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเจริญและอยู่รอดได้ (Bearson *et al*., 1997)

4. จลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตแบบเซ็ท

Table 1 และ 2 แสดงจลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ระหว่างการบ่มและเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบเซ็ท โดยในช่วงการบ่มโยเกิร์ต ABT-5 และ ABY-3 พบการอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.0980 และ 0.0750 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำมาหาเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน *E. coli* O157:H7 เป็น 2 เท่า ในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABT-5 และ ABY-3 มีค่า t_g เท่ากับ 3.07 และ 4.01 ชั่วโมง ตามลำดับ ในช่วงการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 4 8 และ 15°C พบการลดจำนวนลงของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษา ทำให้อัตราการตายจำเพาะ (μ') เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิสูงยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ สอดคล้องกับการลดลงของเวลาการตาย (t_d = 0.301/μ') และค่าอัตราการตาย (k' = μ'/0.301) ของ *E. coli* O157:H7 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิ (Table 2) ส่วนในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อชนิดเดียวกัน พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ต ABT-5 ที่ 15 และ 8°C อัตราการตายของ *E. coli* O157:H7 ไม่แตกต่างกันที่ค่า *td* = 0.16 วัน ขณะที่โยเกิร์ต ABY-3 พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15°C ทำให้อัตราการตายของ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้น มีค่า *td* มากกว่า ที่ 8 และ 4°C แสดงว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ต ABT-5 ที่อุณหภูมิสูงทำให้อัตราการรอดของ *E. coli* O157:H7 หรือยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ดีกว่าการเก็บรักษา

Table 1 Linear regression equations of *E. coli* O157:H7 survival curves and regression coefficients (R^2) during the fermentation with ABT-5 or ABY-3 starter and storage periods at 4, 8 and 15°C

Yoghurt culture	Fermentation			Storage		
	T (°C)	Regression equation*	R^2	T (°C)	Regression equation*	R^2
ABT-5	43	y = 0.0980x+5.7840	0.9854	4	y = -1.0371x+5.4010	0.9456
				8	y = -1.8764x+5.5860	0.9958
				15	y = -1.8771x+5.5629	0.9960
ABY-3	43	y = 0.0750x+5.6083	0.9643	4	y = -0.6376x+5.1022	0.8438
				8	y = -0.7398x+5.7612	0.9495
				15	y = -1.0775x+5.5168	0.9936

* Variables y and x from the linear regression equations represents *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) and time (in hours for fermentation period, days for storage period), respectively.

โยเกิร์ตที่ 4°C ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABY-3 พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15°C ยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้มากกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 8 และ 4°C สอดคล้องกับ Bachrouri *et al*. (2006) ซึ่งรายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 2, 4 และ 8°C ทำให้ค่า *td* ของ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้น ในระหว่างการหมักและเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบพื้นบ้าน

Table 2 Kinetic parameters from growth (μ, t_g and k)* and death period (μ', t_d and k')** for *E. coli* O157:H7 during the fermentation with ABT-5 or ABY-3 starter and storage periods at 4, 8 and 15°C

Yoghurt culture	Fermentation				Storage			
	T (°C)	μ	t_g	k	T (°C)	μ'	t_d	k'
ABT-5	43	0.0980	3.07	0.24	4	-1.0371	-0.29	-2.12
					8	-1.8764	-0.16	-2.46
					15	-1.8771	-0.16	-3.35
ABY-3	43	0.0750	4.01	0.33	4	-0.6376	-0.47	-3.45
					8	-0.7398	-0.41	-6.23
					15	-1.0775	-0.28	-6.24

* μ, t_g and k = specific growth rate (per hour), generation time (h), and growth rate (per day).

** μ', t_d and k' = specific death rate (per hour), death time (h), and death rate (per day).

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสรุปได้ว่าโยเกิร์ตแบบเซ็ทที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ดีกว่า ABY-3 และการเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติกที่ 15°C ยับยั้งการเจริญและลดระยะเวลาในการตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ 8 และ 4°C เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโยเกิร์ตพบว่า การเก็บรักษาที่ 8°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากที่ 8°C สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ เช่นเดียวกับที่ 15°C และปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่คงเหลืออยู่ในโยเกิร์ตโพรไบโอติก ภายหลังการเก็บรักษามีจำนวนมากเพียงพอ (ประมาณ 7 Log CFU/g) ที่จะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ซึ่งการเก็บรักษาที่ 15°C อาจส่งผลถึงคุณภาพด้านประสาทสัมผัส กลิ่นรสที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากกิจกรรมของเชื้อโยเกิร์ต ทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บริษัทโนวาร์ติส จำกัด ที่ให้ทุนเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา และโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ มณีศรี. 2550. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ: โฟร์เพซ.

วชิราภรณ์ ทิพย์ศร บวรศักดิ์ ลีลานนท์ สิงหนาท พวงจันทร์แดง. 2549. ผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต. วารสารวิจัย มข. (บศ.) 6: 1-10.

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลกติกในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1) : 88 – 101.

สิริพร สถนเสาวภาคย์ มาลัย บุญรัตนกิจ และ พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์. 2543. การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร *Escherichia coli* O157:H7. อาหาร. 30 (4): 249-260.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analie, L.H. and Bennie, C.V. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal. 11: 1-17.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official method of analysis of association of official analytical chemists. 15th ed. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, Maryland.

Bachrouri, M., Quinto, E. J. and Mora, M. T. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of yogurt at different temperature. Journal of Food Science. 67: 1899-1903.

Bachrouri, M., Quinto, E. J. and Mora, M. T. 2006. Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. International Dairy Journal, 16: 474-481.

Batjantsan, K. 2007. The effect of probiotics on food pathogen *E. coli* 0157:H7 during fermentation and storage of home - made yogurt. Master's thesis, School of Environment, Resources and Development, Asian Institute of Technology.

Bearson, S., Bearson, B. and Foster, J. W. 1997. Acid stress response in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. 147: 173-180.

Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Sweden.

Chr. Hansen. 2005. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in fermented milk products. Guidelines technical bullentin F-6 method for counting probiotic bacteria. Chr. Hansen, Denmark.

Conner, D. E. and Kotrola, J. S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Applied Environment Microbiology. 61: 382–385.

Dave, R. I. and Shah, N. P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. International Dairy Journal: 31-41.

Gulmez, M. and Guven, A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. Journal of Applied Microbiology. 95: 631-636.

Kasimoglu, A. and Akgün, S. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. International Journal of Food Science and Technology. 39: 563-568.

Karagozlu, N., Cem, K. and Bulent, E. 2007. Survival characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. Czech Journal Food Science. 25: 202-207.

Lankaputhra, W. E. V., and Shah, N.P. 1994. Investigation of factors affecting viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in yoghurt. International Dairy Congress. 30: 18-22.

Mekonnen, T. and Mogessie, A. 2005. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. International Journal of Food Microbiology. 103: 11-21.

Morgan, D., Newman, C. P., Hutchison, D. N., Walker, A. M., Rowe, B. and Majid, F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with the consumption of yoghurt. Epidemiology and Infection. 111: 181-187.

Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V., and de Pace, R. 1997. Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in yogurt during preparation and storage at 4°C. Letters in Applied Microbiology. 24: 347-350.

Tsai, C. C., Lin, P. P. and Hsieh, Y. M. 2007. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grow *in vitro*. Anaerobe. 14: 61-67.

World Health Organization (WHO). 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). [Online]. Available at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fe125/en/ Accessed date on February 13, 2011.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้