

สาขาวิชาโภชนาการ : การผลิตแบคทีเรียโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู (PRODUCTION BACTERIOCINS BY *LACTOCOCCUS LACTIS* TISTR 1401 AND APPLICATION IN PORK MEATBALLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ, 80 หน้า

จุดประสงค์การทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินและเพื่อประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพื่อยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประกอบด้วยสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* supsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* supsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Lb. casei* spp. *rhamnosus* SN11 เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซิน พบว่า *Lc. lactis* TISTR 1401 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ (*Bacillus* sp., TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยง MRS broth มีค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus* sp. TISTR 908 เท่ากับ 3,200 AU/ml นอกจากนี้การปรับปรุงการผลิตแบคทีเรียโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ให้คงที่ที่ 6.5 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียและค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินได้สูงสุด ที่ 12,800 AU/ml ที่ระยะเวลาการเจริญที่ 8 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3,200 AU/ml ที่ระยะเวลาการเจริญที่ 10 ชั่วโมง แบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้มีเสถียรที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ที่ 2 ถึง 8 และสามารถทนความร้อนได้ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่สูญเสียค่ากิจกรรมการยับยั้ง อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะสูญเสียทั้งหมดด้วยเอนไซม์โปรตีนเอส

การประยุกต์ใช้สารละลายแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดยการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 เพื่อการยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู โดยการจุ่มเคลือบ แล้วบรรจุในถุงพลาสติกชนิดแบบปกติ และแบบสุญญากาศ เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างลูกชิ้นหมูระหว่างการเก็บ พบว่า การจุ่มเคลือบลูกชิ้นหมูลงในสารละลายแบคทีเรียโอซินความเข้มข้นเต็มที่ สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างลูกชิ้นได้ $1.96 \log \text{ cfu/g}$ สำหรับการบรรจุแบบปกติ และ $1.42 \log \text{ cfu/g}$ สำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เคลือบด้วยแบคทีเรียโอซิน และตัวอย่างที่จุ่มเคลือบด้วยสารละลายแบคทีเรียโอซินที่เจือจางเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างลูกชิ้นจุ่มเคลือบด้วยสารละลายแบคทีเรียโอซินที่เจือจางลงครึ่งหนึ่งไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจน ($P > 0.05$) ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างได้เฉพาะในวันที่ 12 ทั้งในตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่มีการเคลือบด้วยสารละลายแบคทีเรียโอซิน จุลินทรีย์กลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas* sp. ในตัวอย่างลูกชิ้นหมูที่บรรจุแบบสุญญากาศมีจำนวนลดลงเล็กน้อยเมื่อมีการเคลือบด้วยสารละลายแบคทีเรียโอซิน อย่างไรก็ตามพบว่า สำหรับตัวอย่างบรรจุแบบปกตินั้นไม่พบการลดลงของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ นอกจากนี้ยังไม่พบการเจริญของเชื้อ *Brochothrix thermosphacta* ตลอดระยะเวลาการเก็บ

คุณภาพทางเคมี กายภาพ และทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นเคลือบด้วยสารแบคทีเรียโอซินพบว่าระดับความเป็นกรด-ด่าง และค่าปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยคงที่ที่ 6.5 และ ร้อยละ 0.3 ตามลำดับ การจุ่มลูกชิ้นในสารละลายแบคทีเรียโอซินไม่ส่งผลต่อสีของลูกชิ้นหมู โดยที่ค่า L และ a ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดระยะเวลาการเก็บ ยกเว้นค่า b ของตัวอย่างที่มีการจุ่มในสารละลายแบคทีเรียโอซินความเข้มข้นเต็มที่จะมีค่า b สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างลูกชิ้นด้วยวิธีวิเคราะห์คุณภาพเชิงพรรณนา (QDA) พบว่า การใช้แบคทีเรียโอซินไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ของคุณลักษณะการเยิ้ม น้ำ การเกิดเมือก กลิ่นเน่าเสีย กลิ่นการหืน ลักษณะปรากฏโดยรวม และการยอมรับโดยรวมของตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโอซินส่งผลให้การยอมรับของผู้ทดสอบลดลงในด้านกลิ่นผิดปกติ นอกจากนี้ การใช้แบคทีเรียโอซินในการทดลองนี้ส่งผลให้สีของลูกชิ้นหมูเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างที่บรรจุแบบปกติ สำหรับการบรรจุลูกชิ้นแบบสุญญากาศทำให้การยอมรับโดยรวมของตัวอย่างลูกชิ้นที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโอซินลดลงเมื่อเทียบกับการบรรจุแบบปกติ

SAROJ GOSAARAK : PRODUCTION OF BACTERIOCINS BY
LACTOCOCCUS LACTIS TISTR 1401 AND APPLICATION IN PORK
MEATBALLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANOK-ORN
INTARAPICHET, Ph.D. 80 PP.

BACTERIOCIN/LACTIC ACID BACTERIA/*LACTOCOCCUS LACTIS*

The objectives of the study were to select bacteriocin producing lactic acid bacteria and to apply crude bacteriocins produced by selected bacteria to extend shelf life of pork meatball products. Eight strains of lactic acid bacteria (LAB) obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR): *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* supsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* supsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 and *Lactococcus lactis* TISTR 1401, and *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* SN11 obtained from Prince of Songkla University (PSU) were used for selection of their ability to produce bacteriocins. From the bacteriocin ability test, results indicated that strain of *Lc. lactis* TISTR 1401 exhibited the maximum inhibition activity against indicator bacteria (*Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118) compared with other LAB strains. Bacteriocins produced by *Lc. lactis* TISTR 1401 in MRS broth showed the inhibition activity of 3,200 AU/ml against the indicator bacteria, *Bacillus* sp. TISTR 908. Production of bacteriocins with constantly controlled pH at 6.5 during fermentation gave higher cell population and bacteriocin activity compared with control

fermentation without pH controlling. The inhibition activity reached 12,800 AU/mL at 8 h of microbial growth and 3,200 AU/mL at 10 h of microbial growth for controlled-pH and uncontrolled pH fermentation, respectively. Bacteriocin supernatant was stable at a pH range of 2 to 8 and heat stable at 80 °C for 20 min without loss of its activity. However, the bacteriocin supernatant was completely lost its activity when proteinase enzyme was added.

Studies on application of bacteriocin supernatant produced by *Lc. lactis* TISR 1401 by controlling pH at 6.5 for extended shelf life of pork meatball were performed. The pork meatballs were dipped and coated with crude bacteriocin supernatant (CBS), stored at 4 °C for 12 days in aerobically packed and vacuum packed. The CBS concentration at full strength and half strength were used, compared with control treatment. Total bacterial counts of the full strength CBS coated meatballs were 1.96 and 1.42 log cfu/g for aerobically and vacuum packed, respectively, lower than those treated with half strength and controlled samples. It was found that there was no significant difference between total bacterial counts of meatballs coated with half strength CBS and controlled samples. In case of LAB population, it was detected only at day 12. Slight decrease of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* sp. was observed in the meatballs treated with full strength CBS and packed in vacuum condition. However, decreasing of these bacteria was not observed in aerobically packed samples. In addition, *Brochothrix thermosphacta* was not observed throughout the storage period.

For chemical and physical qualities of coated pork meatballs during storage, pH and total titratable acidity were constant at 6.5 and 0.3 %, respectively. The dipping of pork meatballs in CBS did not affect color and no significant changes of L

and a values were observed throughout the storage period. However, an increase in b value (yellowness) was found for the sample treated with CBS ($P < 0.05$).

For sensory quality, the experiment was evaluated by quantitative descriptive analysis (QDA). The acceptance of panelists for color and abnormal odor decreased for the samples treated with CBS. In addition, the use of CBS gave darker color of the pork meatballs ($P < 0.05$). In case of aerobically packed condition, the significant differences were not observed for the following attributes: water purge, slime, spoiled odor, oxidized odor, overall appearance and overall acceptance. For vacuum packed condition, the significant differences of slime, spoiled odor and oxidized odor were not observed. However, the overall acceptance of panelists was lower compared with those of aerobically packed and controlled treatment.

School of Food Technology

Academic Year 2006

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____