มาลัยพร ศรีวิระ : ผลของแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่ (EFFECTS OF BACTERIOCINS AND ROSEMARY EXTRACTS ON MICROBIAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CHICKEN MEATBALLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ, 116 หน้า.

วัตถุประสงค์การทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ผลิตสารแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่คัดเลือกได้จากลูกชิ้นไก่ และศึกษาผลของสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรีต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ และทางเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่ โดยวิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์ ความเป็นกรดด่าง การเกิดออกซิเดชัน และเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่ขณะเก็บรักษา เก็บเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่จำนวนมาก (dominant flora) แยกและจำแนกได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus saprophyticus* (ประชากร 12%) และ *Bacillus* spp. PN-3 (ประชากร 85%) ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Stapylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687 และ *B. subtilis* TISTR 008) เป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีริโอซินจาก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *Pediococcus acidilactici* TISTR 424 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตสารแบคทีริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่ได้ดีที่สุดคือ *Lc. lactis* TISTR 1401 สารแบคทีริโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% yeast extract, 2% glucose และ 2% meat extract มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. PN-3 เฉลี่ยเท่ากับ 5,333.3 AU/ml มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100ºC เป็นเวลา 20 นาที และมีความเสถียรที่ pH 2-8 นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ชนิดของเหลวข้น (concentrated crude bacteriocins, CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze-dried crude bacteriocins, FDCB) มีประสิทธิภาพการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 3,200 และ 6,400 AU/ml ตามลำดับ

เมื่อใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในการผลิตลูกชิ้นไก่ 2 วิธี คือ 1) เคลือบผิวลูกชิ้นด้วยชนิดปลอดเชื้อด้วยความร้อน (heated crude bacteriocins, HCBS) และชนิดปลอดเชื้อด้วยการกรอง (filtered crude bacteriocins, FCBS) และ 2) ผสมในส่วนผสมลูกชิ้นด้วยชนิดของเหลวข้น (concentrated crude bacteriocins, CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins, FDCB) บรรจุลูกชิ้นแบบปกติ และแบบสุญญากาศ เก็บที่ 4ºC นาน

21 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ ความเป็นกรดด่าง ค่า TBARS และแรงกดของลูกชิ้นไก่ ตามมาตรฐานกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารที่จำนวน 10^5 cfu/g พบว่า การเคลือบลูกชิ้นด้วย HCBS และ FCBS บรรจุแบบปกติ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบไนซินสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 18 วัน และลูกชิ้นควบคุมเก็บได้เพียง 9 วัน สำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นาน 18 วัน 21 วัน และ 12 วัน ตามลำดับ ค่า pH และ TBARS ของลูกชิ้นทุกชนิดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่แรงกดของลูกชิ้นต่างกันเล็กน้อย ($p<0.05$) โดยลูกชิ้นเคลือบด้วยไนซินและบรรจุแบบสุญญากาศมีค่าแรงกดต่ำลงเมื่อเก็บนานขึ้น การผสมสารแบคทีริโอซิน CCB และ FDCB ในส่วนผสมของลูกชิ้นพบว่า เมื่อเก็บลูกชิ้นแบบปกติ การใช้ CCB สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 18 วัน การใช้ FDCB เก็บลูกชิ้นได้นานถึง 21 วัน เท่ากับการใช้ไนซิน ขณะที่ตัวอย่างควบคุมสามารถเก็บได้เพียง 15 วัน และเมื่อเก็บแบบสุญญากาศเก็บได้นานกว่า 21 วัน สำหรับการใช้สารแบคทีริโอซินทุกชนิดรวมทั้งไนซิน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้นานประมาณ 18 วัน ค่า pH และ TBARS ของลูกชิ้นผลิตจากสารแบคทีริโอซินทุกชนิดไม่แตกต่างกัน ค่าแรงกดของลูกชิ้นจากสูงที่สุดไปต่ำที่สุด ($p<0.05$) คือ ลูกชิ้นผลิตด้วยไนซิน CCB, FDCB และลูกชิ้นควบคุมตามลำดับ

การทดลองใช้สารสกัดโรสแมรีชนิด oleoresin rosemary Herbalox® (ORH) ผสมในลูกชิ้นเปรียบเทียบกับสารสกัดโรสแมรีชนิด oil of rosemary (OR) พบว่า ORH สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่ได้ดีกว่า ($p<0.05$) ชนิด OR เมื่อใช้สารสกัด ORH ร่วมกับสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 สำหรับการผลิตลูกชิ้น โดยใช้ ORH ปริมาณ 0.5% ผสมในส่วนผสมลูกชิ้นแล้วเคลือบลูกชิ้นด้วย HCBS (ลูกชิ้น RC) และใช้ ORH ปริมาณ 0.5% และ FDCB ปริมาณ 0.2% ผสมในส่วนผสมลูกชิ้น (ลูกชิ้น MR) พบว่า เมื่อใช้สารสกัดโรสแมรีและสารแบคทีริโอซินผลิตลูกชิ้นแบบ MR สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วัน และการผลิตแบบ RC เก็บลูกชิ้นได้ประมาณ 20 วัน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้ประมาณ 14 วัน เท่านั้นเมื่อบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ และเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วัน 19 วัน และ 16 วัน ตามลำดับ สำหรับการบรรจุลูกชิ้นแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นมีค่า pH ต่างกันเล็กน้อย ($p<0.05$) ลูกชิ้นควบคุมมีค่า TBARS และ hexanal สูงกว่า ($p<0.05$) ลูกชิ้น CR และ MR ตลอดเวลาการเก็บสำหรับการบรรจุทั้ง 2 แบบ นอกจากนี้ค่าแรงกดของลูกชิ้น MR สูงกว่า($p<0.05$) ลูกชิ้น CR และลูกชิ้นควบคุมเล็กน้อย

ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และได้ลูกชิ้นที่มีเนื้อสัมผัสเทียบเท่าสารไนซิน และเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดโรสแมรีทางการค้าชนิด ORH สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บ

ของลูกชิ้นไก่ได้นานขึ้น โดยเสริมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และต้านการเกิดออกซิเดชันของลูกชิ้นได้ดียิ่งขึ้น

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

MALAIPORN SRIWIRA : EFFECTS OF BACTERIOCINS AND ROSEMARY EXTRACTS ON MICROBIAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CHICKEN MEATBALLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANOK-ORN INTARAPHICHET, Ph.D., 116 PP.

BACTERIOCINS/ LACTIC ACID BACTERIA/ ROSEMARY EXTRACTS/ *LACTOCOCCUS LACTIS*

The objectives of the experiment were to screen lactic acid bacteria that could produce bacteriocins with the ability to inhibit indicator bacteria obtained from chicken meatballs, and to study the effects of crude bacteriocins and rosemary extracts on microbial and physico-chemical properties of chicken meatballs. Microbial growth, pH, oxidation and texture of chicken meatballs were analyzed. Two dominant flora bacteria from chicken meatballs were selected and identified as *Staphylococcus saprophyticus* (12% population) and *Bacillus* spp. PN-3 (85% population) and used as indicator bacteria along with other Gram positive; *Stapylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus* sp. TISTR 908, *Bacillus cereus* TISTR 687, and *Bacillus subtilis* TISTR 008, for selection of bacteriocins producing lactic acid bacteria (LAB). Five culture strains of the LAB were used for screening, namely *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *Pediococcus acidilactici* TISTR 424, and *Pediococcus acidilactici* TISTR 051. It was found that *Lc. lactis* TISTR 1401 produced bacteriocins with the highest inhibition activity against indicator bacteria from chicken meatballs. Crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 in MRS broth with the addition of 2% yeast extract, 2% glucose and 2% meat extract had the ability to inhibit *Bacillus* spp. PN-3

with an average of 5,333.3 AU/ml, heat stability 100^{o}C for 20 minutes and pH stability of pH 2-8. In addition, concentrated crude bacteriocins (CCB) and freeze-dried crude bacteriocins (FDCB) showed the inhibition ability of 3,200 and 6,400 AU/ml, respectively.

Crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 were used in chicken meatball production in two different preparations: 1) coating the meatball surface with heated crude bacteriocins supernatant (HCBS) and filtered crude bacteriocins supernatant (FCBS), and 2) mixing in the meatball batter with 0.2% concentrated crude bacteriocins (CCB) and 0.2% freeze-dried crude bacteriocins (FDCB). Nisin in the same concentration was also used for comparison. The meatballs were aerobically packed and vacuum packed, stored at 4^{o}C for 21 days. The meatballs were sampled every 3 days for the analysis of microbial content, pH, TBARS values and compression force. According to the Thai FDA standard for microbial count of $1x10^{5}$ cfu/g food sample, it was found that coated chicken meatballs with HCBS and FCBS, aerobically packed, could be kept for about 15 days while the ones coated with nisin could be kept for 18 days and control for only 9 days. The vacuum packed meatballs could be kept for 18, 21 and 12 days, respectively. pHs and TBARS values of all meatballs were not different ($p>0.05$) while the compression forces were slightly different ($p<0.05$) with the nisin coated meatball and vacuum packed had lower compression force when kept longer. For the CCB and FDCB mixed chicken meatballs, aerobically packed, the CCB mixed meatballs could be kept for about 18 days while the FDCB and nisin mixed meatballs could be kept for up to 21 days, but only 15 days for control samples. Moreover, for vacuum packaging, all bacteriocins treated meatballs could be kept longer than 21 days while control meatballs for about

18 days. pHs and TBARS values of all meatballs were not different. However, significant differences of compression forces were found in the order from low to high of nisin, CCB and FDCB mixed, and control meatballs, respectively.

Two different rosemary extracts, oleoresin rosemary Herbalox® (ORH) and oil of rosemary (OR) were used in comparison for antimicrobial and antioxidant ability in chicken meatballs. It was found that the ORH showed better activity ($p<0.05$) than the OR. The ORH was used incorporation with crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 in chicken meatball production in two different preparations. The meatballs were made by mixing 0.5% ORH in the batter and then, coated with HCBS (RC meatballs). Another batch was made by mixing 0.5% ORH and 0.2% FDCB in the batter (MR meatballs). It was found that for aerobically packed, the MR meatballs could be kept longer than 21 days and the RC meatballs for about 20 days while the control meatballs could be kept for about 14 days, and for vacuum meatballs 21, 19 and 16 days, respectively. For both packing types, slightly different ($p<0.05$) pHs of the meatballs were observed. TBARS and hexanal contents of the control meatballs were higher ($p<0.05$) than those of RC and MR meatballs throughout storage time for both types of packing. In addition, the MR meatballs had slightly higher compression force ($p<0.05$) than RC and control meatballs.

Therefore, it could be mentioned that crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 had the ability to inhibit microbial growth and provided meatballs with the texture equally to nisin. The use of crude bacteriocins in combination with commercial rosemary extracts, ORH, could reduce microbial numbers and help to

extend longer shelf life of chicken meatballs by a good synergism in antimicrobial and antioxidant activities.

School of Food Technology

Academic Year 2008

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor Signature_____