

Thesis Title	Effects of Chitosan on Food Spoilage Bacteria
Author	Miss Atchareeya Chomchoei
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisor	Dr. Sasithon Wongroung

ABSTRACT

The antimicrobial properties of chitosan against food spoilage bacteria were investigated in order to assess the potential of using this natural product as a food preservative by decreasing the contamination of some food-borne microorganisms. The results from *in vitro* study showed that chitosan markedly inhibited the growth of some food spoilage bacteria tested. *Micrococcus luteus* was the most sensitive bacteria, followed by *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of chitosan required to completely inhibit the bacterial growth after incubation for 24 hr. The MIC value was varied between 0.04 to 0.06% (w/v) for these four studied bacteria. The growth of *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens* could not be completely inhibited after applying a concentration of chitosan as high as 0.08% (w/v). The effect of chitosan molecular weights on the chitosan ability to inhibit microorganisms were compared between a low molecular weight chitosan (150,000 Da) and a medium molecular weight chitosan (400,000 Da). The results showed that the activity of these chitosans were significantly different ($p < 0.05$) for *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* at chitosan concentrations of 0.02% and 0.04% (w/v).

A study about the antimicrobial activity of chitosan in a mixed culture of *M. luteus* and *B. cereus* showed that chitosan had a great effect on *M. luteus* but it had a less effect on *B. cereus*, when the results were compared to the control.

A correlation between the antimicrobial activity of chitosan and pH was investigated. The antibacterial activity of chitosan showed a great effect on *M. luteus* at pH 5.0, 5.5 and 6.0, but its growth was reduced at low pH value of 4.0 and 4.5 even in the absence of chitosan. For *B. cereus*, the cell growth was reduced at pH 4.0, 4.5 and 5.5 and the growth rate was delayed in the lag and log phases at pH 5.5 and 6.0 in the presence of chitosan. The effect of temperature on the antibacterial activity of chitosan against *M. luteus* and *B. cereus* was shown that chitosan had no difference in its inhibitory effect against the two organisms at two tested temperature (25 and 37°C).

The effect of cell population of microorganisms on the antimicrobial activity of chitosan was also observed for *M. luteus* and *B. cereus*. The result showed that chitosan had no antimicrobial activity when the initial microbial populations were more than 9.1×10^9 and 6.2×10^8 CFU/ml for the *M. luteus* and *B. cereus*, respectively.

A study about the antimicrobial activity of chitosan on some microorganisms in the minced pork was also investigated. The cell numbers of aerobic bacteria and lactic acid bacteria were reduced about 0.5 to 1.0 log CFU/g during 10 days storage at 4°C. The antimicrobial activity of chitosan on these two target organisms with a final concentration of 0.05% (w/v) is better than 0.025% (w/v) during storage. Moreover, *Salmonella-Shigella* spp. and *E. coli* in the minced pork were completely inhibited by both chitosan concentrations after 2 days storage at 4°C.

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของไคโตซานต่อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย

ผู้เขียน

น.ศ. อัจฉริยา ชมเชย

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. ศศิธร วงศ์เรือง

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย เพื่อที่จะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็นสารธรรมชาติเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารและช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์บางกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค ผลการทดลองในหลอดทดลอง พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ เชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญได้มากที่สุดคือ *Micrococcus luteus* เชื้อที่ถูกยับยั้งรองลงมาได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ตามลำดับ พบว่า ค่าความเข้มข้นของไคโตซานน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้อย่างสมบูรณ์หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 0.04% ถึง 0.06% (w/v) อย่างไรก็ตาม พบว่า ไคโตซานมีผลน้อยมากในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Serratia marcescens* โดยถูกยับยั้งการเจริญได้เพียงบางส่วน ที่ความเข้มข้นของไคโตซานสูงถึง 0.08% (w/v) จากการทดลองผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสองระดับ คือ ระดับต่ำ (150,000 Da) และ ระดับปานกลาง (400,000 Da) พบว่า เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยไคโตซานทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.02% และ 0.04% (w/v) กับเชื้อ *En. aerogenes* และ *E. coli*

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของโคโคซานที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด (mixed culture) ในอาหารเหลว พบว่า โคโคซานมีประสิทธิภาพดีเยี่ยมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. luteus* แต่มีผลเล็กน้อยต่อการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม เมื่อศึกษาผลของระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของโคโคซานต่อเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าการเจริญของเชื้อ *M. luteus* ในชุดทดลองที่มีการเติมโคโคซานจะถูกยับยั้งได้ดีที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 5.0, 5.5 และ 6.0 แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการเจริญของเชื้อ *M. luteus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.0 และ 4.5 แม้ว่าจะไม่มีการเติมโคโคซาน สำหรับ *B. cereus* พบว่า การเจริญของเชื้อ *B. cereus* ลดลงที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.0, 4.5 และ 5.0 อีกทั้งยังพบว่าอัตราเร็วในการเจริญของเชื้อดังกล่าวช้าลงในช่วง lag และ log phase ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 5.5 และ 6.0 ในชุดการทดลองที่มีการเติมโคโคซาน เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของโคโคซานที่มีต่อ *M. luteus* และ *B. cereus* พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันที่ระดับอุณหภูมิ 25°C และ 37°C

การศึกษาผลของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีต่อประสิทธิภาพการทำงานของโคโคซาน พบว่า โคโคซานจะไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. luteus* และ *B. cereus* เมื่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลวมากกว่า 9.1×10^9 และ 6.2×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของโคโคซานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางกลุ่มในเนื้อหมูปด พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria และ lactic acid bacteria ลดลง 0.5 ถึง 1.0 log CFU/g ตลอดช่วง 10 วันของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของโคโคซานทั้งสองความเข้มข้นพบว่าโคโคซานที่ระดับความเข้มข้น 0.05% (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มในเนื้อหมูปดได้ดีกว่า 0.025% (w/v) ในขณะที่ *Salmonella-Shigella* spp. และ *E. coli* ในเนื้อหมูปดถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดยโคโคซานทั้งสองความเข้มข้นหลังจากวันที่ 2 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C