# Development of Encapsulation Systems for Controlled Release of Natural Antimicrobial Agent and Their Applications in Nham

*Somchoke Kittisakulnam and Worapot Suntornsuk*

## Abstract

This research was aimed at development of encapsulation system with controlled releasing antimicrobial activity. The prospective result of this research was to use these particles for novel food preservation. A tested food model in this study was Thai fermented sausage (Nham). Firstly, screening for bioactive substances was investigated. The extracts obtained from Thai spices normally used in fermented meat products including garlic (*Allium sativum*), pepper (*Piper nigrum*) and bird chili (*Capsicum frutescens*), remarkably exhibited the antioxidant activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ($DPPH^{\bullet}$) and 2,2´-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical ($ABTS^{\bullet+}$) as well as ferric reducing antioxidant power (FRAP). Ethanolic extracts gave higher antioxidant capacities than the aqueous extracts. Garlic extract with hot water showed the highest antibacterial activities against foodborne pathogens (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and fermented foods associated lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. Pentosus* and *L. Plantarum*). Hence, the garlic extract with hot water was chosen for next experiments.

Stability test of selected garlic extract (GE) was done. Allicin, which is the most important bioactive substance in garlic homogenate, was stable under refrigerated conditions (4 and 10°C). Mildly acidic condition of fermented foods (pHs 4-6) did not affect allicin stability. At pH 4.5, acidified garlic extract still exhibited strong antibacterial activities against tested bacteria including *E. coli*, *S. aureus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sake* and *Pediococcus pentosaceus*.

The active particle forming processes with 2 potent biopolymers including chitosan (CS) and alginate (ALG) were demonstrated. Chitosan which was positively charged gave higher compatibility with allicin and garlic extract than negatively charged alginate. However, the particles of CS/GE gave low allicin loading efficiency (less than 9%), regardless the core-shell weight ratios and CS molecular weights. Conversely, calcium-ionotropic ALG bead forming technique exhibited the highest allicin loading efficiency up to 81%. Concentrations of ALG and calcium ions considerably influenced allicin loading efficiency and morphology of ALG/GE beads. Solidification of the beads in mild acid solution could develop controlled releasing behavior in mildly acidic state.

Controlled releasing characteristic of active ALG/GE beads was studied in a Nham model. Allicin in the beads was slowly released into food matrix without any negative effect on Nham fermentation. However, the anti-LAB activities from released allicin were not enough to suppress LAB growth after complete fermentation.

The application of ALG/GE beads as a novel technique is an alternative for food preservation and they should be further developed for food ingredients or pharmaceutical dosages in the future.

Keywords: Alginate Based Bead / Allicin / Antibacterial Agent / Antioxidant / Controlled Release / Garlic Extract

# การพัฒนาระบบการกักเก็บเพื่อการควบคุมการปลดปล่อยของสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติและการประยุกต์ใช้ในแหนม

*สมโชค กิตติสกุลนาม และ วรพจน์ สุนทรสุข*

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อพัฒนาระบบการกักเก็บที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยกิจกรรมการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ โดยคาดหวังให้เป็นวิธีการถนอมอาหารชนิดใหม่ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบอนุภาคออกฤทธิ์ในการศึกษานี้ คือ ผลิตภัณฑ์แหนม ผลการศึกษาในส่วนของการคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดจากเครื่องเทศที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทย ได้แก่ กระเทียม พริกไทย และพริกขี้หนู สามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) และ 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ($ABTS^{\bullet+}$) และกิจกรรม Ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยพบว่ากลุ่มของสารสกัดเครื่องเทศด้วยเอทานอลแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากลุ่มของสารสกัดจากน้ำ นอกจากนี้สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำร้อนออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค (*Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (*Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. pentosus* และ *L. plantarum*) ได้ดีที่สุด ดังนั้นสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำร้อนจึงถูกเลือกใช้ในการทดลองส่วนต่อไป

ผลการศึกษาของการทดสอบความคงตัวของสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำร้อน พบว่า อัลลิซินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการแสดงกิจกรรมออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกระเทียมมีความคงตัวได้ดีในอุณหภูมิต่ำ (4 และ 10 องศาเซลเซียส) และสภาวะความเป็นกรดของอาหารหมัก (pH 4-6) ไม่มีผลต่อความคงตัวของอัลลิซิน โดยที่สภาวะ pH 4.5 สารสกัดกระเทียมสามารถออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียกลุ่มทดสอบ (*E. coli*, *S. aureus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sake* และ *Pediococcus pentosaceus*)ได้ดี

ผลการศึกษาของการทดสอบขึ้นรูปอนุภาคออกฤทธิ์ด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพ 2 ชนิด ได้แก่ ไคโตซานและอัลจิเนต พบว่าไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ให้ประจุพื้นผิวเข้าคู่กับอัลลิซินและสารสกัดกระเทียมได้มากกว่าอัลจิเนต แต่ผลการขึ้นรูปอนุภาคไคโตซานร่วมกับสารสกัดกระเทียมพบว่าระบบนี้ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บต่ำ (น้อยกว่า 9 %) โดยอัตราส่วนและขนาดโมเลกุลของไคโตซานไม่มีผลต่อการพัฒนาประสิทธิภาพการกักเก็บ ในทางตรงกันข้ามการขึ้นรูปบีดอัลจิเนตออกฤทธิ์ร่วมกับแคลเซียมไอออนสามารถให้ประสิทธิภาพการกักเก็บอัลลิซินมากถึง 81% โดยพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตและแคลเซียมไอออนมีผลต่อประสิทธิภาพของการกักเก็บอัลลิซินและสัณฐานวิทยาของบีดออกฤทธิ์ นอกจากนี้พบว่าการขึ้นรูปบีดอัลจิเนตออกฤทธิ์ในกรดอ่อนสามารถพัฒนาพฤติกรรมการควบคุมการปลดปล่อยอัลลิซินภายใต้สภาวะกรดอ่อนได้ดีขึ้น

ผลการศึกษาของการทดสอบการควบคุมการปลดปล่อยของบีดออกฤทธิ์ในตัวอย่างอาหารหมักแหนม พบว่าบีดออกฤทธิ์สามารถปลดปล่อยอัลลิซินสู่โครงสร้างอาหารโดยไม่มีผลต่อการหมักของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก แต่ยังคงไม่สามารถออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกหลังจากการหมักสิ้นสุดลง

การถนอมอาหารโดยใช้บีดอัลจิเนตออกฤทธิ์ร่วมกับสารสกัดกระเทียมยังคงเป็นวิธีการถนอมอาหารวิธีใหม่ที่น่าสนใจและมีแนวโน้มในการพัฒนาต่อไปเพื่อการประยุกต์ใช้ในอาหารและเภสัชกรรมในอนาคต

คำสำคัญ: การควบคุมการปลดปล่อย / บีดอัลจิเนตออกฤทธิ์ / สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย / สารต้านอนุมูลอิสระ / สารสกัดกระเทียม / อัลลิซิน