

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACID-SENSITIVE
Lactobacillus plantarum BCC 9546, A STARTER CULTURE FOR
NHAM PRODUCTION**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2010**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACID-SENSITIVE *Lactobacillus plantarum* BCC 9546, A STARTER CULTURE FOR NHAM PRODUCTION

PORN PAN JAICHUMJAI 4937301 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: APINYA ASSAVANIG, Ph.D. PETER KURDI, Ph.D. THUNYARAT PONGTHARANGKUL, Ph.D.

ABSTRACT

This thesis reports the potential of an acid-sensitive *L. plantarum* mutant to be used as a starter to reduce the post-acidification of Nham, a Thai-fermented sausage, during storage at ambient temperature (30 °C). Acid-sensitive mutants of *L. plantarum* BCC 9546 were successfully isolated by selecting neomycin resistant mutants. Three representative acid-sensitive mutants (R5, R5-18 and N750-1) were used in this trial. In MRS broth, their growth and acid production (at 30 °C for 48 hours) were lower and their culture broth pH were higher than that of the wild-type strain. Mutant N750-1 had the highest pH of culture broth at the end of the 72 hours culturing period. The mutants had reduced H⁺-ATPase activity in acidic condition (pH 5.0) corresponding to their lower internal pH than the wild-type strain. Besides, the arginine deiminase activities were not found while glutamate decarboxylase activities were found to be very low in the tested *L. plantarum* strains. Finally, a Nham fermentation trial was carried out at 30 °C for 3 weeks. Nham fermented by the wild-type strain had significantly higher amounts of released water than Nham fermented by the mutant, but they showed no significant difference in color. Although biogenic amines content was found to be higher in mutant fermented Nham, the value was below the allowable maximum level in food. In conclusion, Nham fermented by the mutant had longer shelf-life and less post-acidification, which gave a consistent product pH of about 4.6 for longer than the one fermented by wild-type.

KEY WORDS: ACID-SENSITIVE MUTANT/ H⁺-ATPase/ INTERNAL pH

102 pages

การคัดเลือกและการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 ที่มีความไวต่อความเป็นกรดเพื่อใช้เป็นต้นเชื้อในการผลิตแหนม

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACID-SENSITIVE *Lactobacillus plantarum* BCC 9546, A STARTER CULTURE FOR NHAM PRODUCTION

พรพรรณ ใจชุ่มใจ 4937301 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อภิญญา อัสวานิก, Ph.D., Peter Kurdi, Ph.D., รัชฎูรัตน์ พงศ์ทรงกร, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้รายงานศักยภาพการใช้เชื้อ *L. plantarum* ที่มีความไวต่อกรดเป็นต้นเชื้อในการผลิตแหนมระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ *L. plantarum* ที่มีความไวต่อกรด จากเชื้อที่มีคุณลักษณะด้านยาปฏิชีวนะนีโอมัยซิน (neomycin) มา 3 สายพันธุ์ อันได้แก่ R5, R-18 และ N750-1 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป MRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อดังกล่าวมีการเจริญและผลิตกรดในปริมาณที่น้อยกว่าในสายพันธุ์ wild type ซึ่งสอดคล้องกันกับค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูงกว่าในสายพันธุ์ wild type นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ N750-1 ให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด ณ จุดสิ้นสุดการเลี้ยงคือ 72 ชั่วโมง เชื้อที่มีความไวต่อกรดทั้งหมดดังกล่าวยังมีคุณสมบัติในการลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตอนเอทีพีเอส (H^+ -ATPase) ในสถานะที่เป็นกรดคือ pH 5.0 ซึ่งสอดคล้องกับการมีค่า pH ข้างในเซลล์ (internal pH) ต่ำกว่าในสายพันธุ์ wild type นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ทั้งหมดข้างต้นไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อาร์จินีน ดีอิมิเนส (Arginine deiminase) แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามเมท ดีคาร์บอกซิเลส (glutamate decarboxylase) ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อนำสายพันธุ์ wild type และ N750-1 หมักแหนมเป็นระยะเวลา 3 อาทิตย์โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษาพบว่าแหนมที่หมักโดยต้นเชื้อ wild type นั้นมีปริมาณน้ำที่ไหลออกมาจากแหนมมากกว่าแหนมที่หมักโดยใช้ต้นเชื้อ N750-1 แต่สีของแหนมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าจะพบปริมาณไบโอจีนิกเอมีนมากในแหนมที่หมักโดยต้นเชื้อ N750-1 ก็ยังอยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าระดับสูงสุดที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร สรุปได้ว่า แหนมที่หมักโดยต้นเชื้อที่มีความไวต่อกรด N750-1 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาแหนมได้นานกว่าแหนมที่หมักโดยต้นเชื้อ wild type และทำให้แหนมมีค่าความเป็นกรดหลังการเก็บรักษาน้อยกว่าในสายพันธุ์ wild type โดยทำให้ผลิตภัณฑ์แหนมนั้นรักษาระดับค่า pH ลงที่ประมาณ 4.6