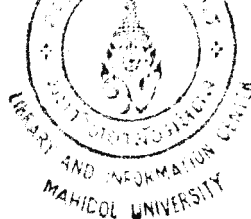


12 MAY 2000



**MOLECULAR TYPING OF LACTIC ACID BACTERIA
ISOLATED DURING NHAM FERMENTATION**

SUKUN KUNAWASEN

**With compliments
of**

ศาสตราจารย์ ดร. นงนิตย์ นงนิตย์

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(FOOD AND NUTRITION FOR DEVELOPMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-663-676-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S948m
2000

43891 c.a

Copyright by Mahidol University

3736067 NUFN/M : MAJOR : FOOD AND NUTRITION FOR DEVELOPMENT;
M.Sc. (FOOD AND NUTRITION FOR DEVELOPMENT)

KEY WORDS : NHAM/ FERMENTED FOOD/ LACTIC ACID BACTERIA/
RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

SUKUN KUNAWASEN: MOLECULAR TYPING OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED DURING NHAM FERMENTATION. THESIS ADVISORS: VISITH CHAVASIT, Ph.D. RUUD VALYASEVI, Ph.D. 162 p. ISBN 974-663-676-6.

Nham is one of the most favorite Thai traditional fermented meat products. Quality variation in Nham could affect acceptability and safety of the product. Such problem could be prevented by using the right of starter microorganisms for fermentation. The purpose of this study is to genetically identify the dominant groups of lactic acid bacteria important to the fermentation process of Nham. The polymerase chain reaction conditions and suitable oligonucleotide primers were screened for use in the molecular typing of lactic acid bacteria isolated from Nham fermentation. The method was able to differentiate closely related bacterial strains by their polymorphic differences. Based on these results, all the bacterial isolates were genetically grouped. The molecular typing method together with the phenotypic characteristics were used to identify selected strains of lactic acid bacteria from these genetic groups. In Nham I, 12 different genetic groups (A to L) were identified and only four were found to be dominant. Group A were identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* and were dominant throughout the fermentation with the proportion of population increased from 9 to 33%. Groups D and F were identified as *Lactobacillus* spp. and *Lactobacillus paracasei* respectively. They were also dominant throughout the fermentation. Group J identified as *Pediococcus pentosaceus*, was found at 36 h constituted 2% of the total population and increased to 22% at 84 h. The increase in the proportion of populations from groups D and F correlated well with the rapid decrease in pH from 6.2 to 4.6. Whereas the increase in the population of group J at the latter phase of fermentation from 36 to 84 h did cause a rapid decrease in pH from 4.9 to 4.6. However different bacterial profiles isolated from another production batch of Nham I and from 3 different commercial brands, II, III and VI, were observed. The bacterial strains found in another batch of Nham I were *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus sake* and *Enterococcus* spp. For other 3 commercial brands, *Lactobacillus graminis*, *L. sake*, *L. farciminis*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, and *L. homohiochii* were found. The results could be used as the basic information for selecting lactic acid bacteria to be used as starter in Nham fermentation.

3736067 NUFN/M : สาขาวิชา: อาหารและโภชนาการเพื่อการพัฒนา; วท.ม.

(อาหารและโภชนาการเพื่อการพัฒนา)

ศุภคุณ คุณะวเสน: การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ระหว่างกระบวนการหมักแหนม (MOLECULAR TYPING OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED DURING NHAM FERMENTATION). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิไลฐ จะวะสิต, Ph.D. รุจ วัลยะเสวี, Ph.D. 162 หน้า. ISBN 974-663-676-6.

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านประเภทเนื้อสัตว์ที่เป็นที่นิยมอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอของแหนมมีผลต่อการยอมรับและความปลอดภัยในการบริโภค การใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสมจะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อที่จะพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีบทบาทต่อกระบวนการหมักโดยใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ การคัดเลือก oligonucleotide primers ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูกโซ่ในการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมักแหนม วิธีการนี้สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงออกจากกันโดยใช้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากความแตกต่างดังกล่าวนี้จึงนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหนมตามลักษณะทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะการแสดงออกหรือฟีนอไทป์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบทบาทในกระบวนการหมักแหนม 4 ยี่ห้อ (I, II, III และ VI) จากการศึกษาแหนมยี่ห้อ A พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความแตกต่างในระดับพันธุกรรมทั้งหมด 12 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A ถึงกลุ่ม L. ในจำนวนนี้พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ 4 กลุ่มที่สามารถพบได้ตลอดกระบวนการหมัก ได้แก่ กลุ่ม A, กลุ่ม D, กลุ่ม F และกลุ่ม J. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่ากลุ่ม A เป็นเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 9% ในช่วงแรกของการหมักเป็น 33% ในเวลาการหมักที่ 84 ชั่วโมง ส่วนกลุ่ม D เป็น *Lactobacillus* spp. และกลุ่ม F เป็น *Lactobacillus paracasei* ซึ่งพบภายหลังจากการหมักที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือ pH ลดลงจาก 6.2 เหลือ 4.6 กลุ่ม J เป็น *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งพบครั้งแรกประมาณ 2% ที่เวลาการหมัก 36 ชั่วโมง และพบเพิ่มมากขึ้นเป็น 22% ที่เวลาการหมัก 84 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาแหนมยี่ห้อ A ซึ่งผลิตในเวลาการหมักที่แตกต่างจากตัวอย่างแรก พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องต่างชนิดกันออกไป ได้แก่ *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus sake* และ *Enterococcus* spp. และเมื่อศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกจากแหนมยี่ห้ออื่นอีก 3 ยี่ห้อ ได้แก่ II, III และ VI พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆนั้นเป็น *Lactobacillus graminis*, *L. sake*, *L. farciminis*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. plantarum* และ *L. homohiochii*. โดยผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่จะนำมาใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักแหนม