- 2 NOV 2001

OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS OF *Halobacterium salinarium* strain AO2 AND *Tetragenococcus halophilus* strain TS64 RELATED TO FISH SAUCE (NAMPLA) FERMENTATION

NATTIMA EUNGRUTTANAGORN

คลินันทนาคาร
ขอ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

ISBN 974-664-201-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
N2880
2000

3936483 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : *Halobacterium salinarium* / *Tetragenococcus halophilus* / Fish sauce

NATTIMA EUNGRUTTANAGORN : OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS OF *Halobacterium salinarium* strain AO2 and *Tetragenococcus halophilus* strain TS64 RELATED TO FISH SAUCE (NAMPLA) FERMENTATION. THESIS ADVISORS: CHAUFAH THONGTHAI, Ph.D., VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D., ATTAWUT IMPOOLSUP, Ph.D. 160P. ISBN 974-663-839-4

H.salinarium strain AO2 (a good protease producer) and *T.halophilus* strain TS64 (a lactic acid bacterium) were cultivated to increase the number of cells in order to be used as starters with the ultimate aim to accelerate the process of fish sauce production on an industrial scale. Both *H.salinarium* and *T.halophilus* were generally found in the traditional process of fish sauce fermentation. They were characterized and optimized for growth parameter. Thereafter an attempt was made to cultivate them in a cheap medium, NTKP, a by-product from fish sauce production. This medium was used as a basal medium for culturing these microorganisms instead of more expensive imported commercial media (SGM, MRS).

The appearances of NTKP were a light amber color and clear with a small amount of sediment. They smelled strongly of a fishy and salty odor. Five samples of NTKP showed average values of total nitrogen 0.33% (w/v), protein 2.05% (w/v), pH uniformly 5.95, NaCl 30.05%(w/v), sulfate 0.03233 g/l, phosphate 2.2981 mg/l, 25.08-25.69%ash (w/w), 0.035 mg potassium/l, 3.18g magnesium/l, <0.85 mg manganese/l and <1.639 mg iron/l. It was found that microorganisms could grow on NTKP and grew well on 20%NaCl SGM under aerobic condition. Organisms found on NTKP were red pigments, both staining in gram positive and negative, shaped as rod and cocci, having total viable cell counts of $2x10^4$CFU/ml. Bacterium in NTKP was rarely cultivable in all media under culturing in anaerobic conditions or in media containing 0% and 10%NaCl under aerobic conditions.

The optimal and economical growth conditions of AO2 employed to scale up for increasing cell number to industrial scale were found to be 37°C, 25%NaCl and initial pH6.5 in NTKP alone. Inoculum size was $2x10^5$ CFU/ml. AO2 was scaled up to 3L medium volumes in 6L Erlenmeyer flask giving good maximal cell concentration of upto $4x10^8$CFU/ml.

The optimal and economical conditions for growth of TS 64 for increasing cell number to industrial scale were found to be 30°C, pH5.95, 10%NaCl in NTKP. Inoculum size was $1.8x10^6$ CFU/ml. TS64 was scaled up to 5L in 6L Erlenmeyer flask giving good maximal cell concentration of upto $5x10^8$CFU/ml.

These studies demonstrated the high potential usage of a cheap by-product of a fish sauce factory to cultivate starters for an accelerated process of fish sauce production in place of expensive imported media.

3936483 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

นัตติมา อึงรัตนากร : สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *Halobacterium salinarium* และ *Tetratogenococcus halophilus* ที่เกี่ยวข้องในการหมักน้ำปลา (OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS OF *Halobacterium salinarium* strain AO2 and *Tetragenococcus halophilus* strain TS64 RELATED TO FISH SAUCE (NAMPLA) FERMENTATION). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ช่อฟ้า ทองไทย, Ph.D., วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., อรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์, Ph.D. 160 หน้า. ISBN 974-663-839-4

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *H. salinarium* สายพันธุ์ AO2 (ซึ่งย่อยสลายเนื้อปลา) และเชื้อ *T. halophilus* สายพันธุ์ TS64 (ซึ่งผลิตกรดแลคติค) มาเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับเร่งการหมักน้ำปลา ซึ่งตามธรรมชาติจะพบเชื้อทั้งสองนี้ได้ในช่วง 1 เดือนแรกของการหมัก เชื้อทั้งสองนี้ถูกนำมาศึกษาลักษณะและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำจากผลิตผลข้างเคียงของโรงงานน้ำปลา โดยเพาะเลี้ยงถึงปริมาตร 6 ลิตร เพื่อที่จะนำไปขยายเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

น้ำต้มกากปลาเป็นเศษผลิตผล (By-product) ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำปลาดังนั้นจึงมีราคาถูก ลักษณะทั่วไปคือมีสีเหลือง ตะกอนเล็กน้อย และมีกลิ่นคล้ายกลิ่นคาวปลา องค์ประกอบในน้ำต้มกากปลาจาก 5 ตัวอย่างมีค่าเฉลี่ยดังนี้คือ โปรตีน 2.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, ไนโตรเจนทั้งหมด 0.33% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, พีเอช 5.95, โซเดียมคลอไรด์ 30.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, ซัลเฟต 0.32 กรัม/ลิตร, ฟอสเฟต 2.298 มิลลิกรัม/ลิตร, แมกนีเซียม 3.18 กรัม/ลิตร, แมงกานีส น้อยกว่า 0.85มิลลิกรัม/ลิตร, โปตัสเซียม 0.035 มิลลิกรัม/ลิตร, เหล็กน้อยกว่า 1.639 มิลลิกรัม/ลิตร และพบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญในน้ำต้มกากปลาและเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 20%โซเดียมคลอไรด์ในสภาพที่มีอากาศ และแทบจะไม่พบจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาพที่ไม่มีหรือมีอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0% และ 10%โซเดียมคลอไรด์ โคโลนีที่พบส่วนมากเป็นสีแดง แกรมลบ รูปแท่งและกลม มีจำนวนเซล $2x10^4$ โคโลนี/มิลลิลิตร

สภาวะที่เหมาะสมและประหยัดต่อการเจริญของ AO2 ซึ่งเหมาะสมจะขยายอัตราส่วนปริมาณเชื้อในระดับอุตสาหกรรมต่อไปคือใช้พีเอชเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 37°C และเจือจางน้ำต้มกากปลาด้วยน้ำกลั่นจนได้ 25% โซเดียมคลอไรด์ โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอื่นลงไป ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้คือ $2x10^5$ โคโลนี/มิลลิลิตร เชื้อเพิ่มได้ถึง $4x10^8$ โคโลนี/มิลลิลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมและประหยัดค่าใช้จ่ายต่อการเจริญของ TS64 ซึ่งเหมาะสมจะใช้ขยายอัตราส่วนปริมาณเชื้อในระดับอุตสาหกรรมต่อไปคือใช้พีเอชเริ่มต้น 5.95 อุณหภูมิ 30°C และเจือจางน้ำต้มกากปลาด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10% โซเดียมคลอไรด์ โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอื่นลงไป ปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ $2x10^6$ โคโลนี/มิลลิลิตรและเพิ่มเชื้อได้ถึง $5x10^8$ โคโลนี/มิลลิลิตรTS64สามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยและไม่มีออกซิเจนเลย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยะของการใช้เศษผลิตผลราคาถูกจากโรงงานน้ำปลาแทนที่อาหารเลี้ยงเชื้อนำเข้าราคาแพงซึ่งจะใช้ผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้เร่งขบวนการผลิตน้ำปลาแบบเร่งรัดต่อไปได้