

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47348



CHARACTERIZATION, IDENTIFICATION AND SELECTION
OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI
TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGE (MHOM)
FOR THEIR POTENTIAL USE AS
STARTER CULTURES

MRS. WANNEE SAMAPPITO

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY

2010



E47348



**CHARACTERIZATION, IDENTIFICATION AND SELECTION
OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI
TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGE (MHOM)
FOR THEIR POTENTIAL USE AS
STARTER CULTURES**



MRS. WANNEE SAMAPPITO

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2010

**CHARACTERIZATION, IDENTIFICATION AND SELECTION
OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI
TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGE (MHOM)
FOR THEIR POTENTIAL USE AS
STARTER CULTURES**

MRS. WANNEE SAMAPPITO

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN FOOD TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2010



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN FOOD TECHNOLOGY

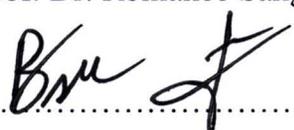
Thesis title: Characterization, Identification and Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Sausage (Mhom) for Their Potential Use as Starter Cultures

Author: Mrs. Wannee Samappito

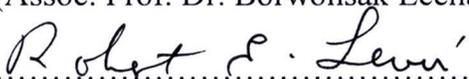
Thesis Examination Committee

Assoc. Prof. Dr. Singhanat Phoungchandang Chairperson
Asst. Prof. Dr. Romanee Sanguandeeikul Member

Thesis Advisors:

.....  Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Borwonsak Leenanon)

.....  Co-Advisor

(Prof. Dr. Robert E. Levin)

.....  

(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

(Asst. Prof. Dr. Kasem Nantachai)

Dean, Graduate School

Dean, Faculty of Technology

วรรณิ สมป์ปีโต. 2010. การประเมินคุณลักษณะ การจำแนก และการคัดเลือกแลคติกแอซิด
แบคทีเรียที่แยกได้จากไส้กรอกหมักพื้นบ้านของไทย(หม้า)เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก.
วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. บวรศักดิ์ ลีนานนท์,
Prof. Dr. Robert E. Levin

บทคัดย่อ

E 47348

หม้าเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักพื้นบ้านของไทยซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคของประชาชนใน
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีมาใช้ปรับปรุงกระบวนการผลิตหม้ายังมีน้อยมาก ดังจะเห็นได้จากกระบวนการผลิตซึ่ง
ใช้วิธีดั้งเดิมโดยไม่ได้ใช้เชื้อเริ่มต้น แต่จะอาศัยทักษะและประสบการณ์ในการผลิตมากกว่า
เทคโนโลยี ดังนั้นกระบวนการผลิตจึงขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีอยู่ใน
วัตถุดิบ ทำให้ผลผลิตที่ได้ในแต่ละรอบการผลิตมีคุณภาพแตกต่างกัน เช่น กลิ่น เนื้อสัมผัส คุณค่า
ทางอาหาร ความปลอดภัย และคุณลักษณะอื่นๆ ของหม้า การแยกและการคัดเลือกแลคติกแอซิด
แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสามารถช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ ปลอดภัย และใช้
ระยะเวลาสั้นในการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก และศึกษาคุณลักษณะของ
เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติของหม้า นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและ
ศึกษาคุณลักษณะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ต้องการเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม โดยอาศัย
คุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้
ปริมาณสูง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตหม้า โดยนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก
มาศึกษาประสิทธิภาพการหมักร่วมกัน และติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ใน
ระหว่างกระบวนการหมักหม้า ตัวอย่างหม้าที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อในการศึกษานี้มาจาก 5 แหล่ง
จากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ได้แก่ ชัยภูมิแหล่งที่ 1 (Chaiyaphum 1,
CP1) ชัยภูมิแหล่งที่ 2 (Chaiyaphum 2, CP2) ขอนแก่น (Khon Kaen, KK) มหาสารคาม (Maha
Sarakhom, MK) และกาฬสินธุ์ (Kalasin, KS) จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างหม้ามีจำนวน
เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา แลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Micrococaceae*, *enterococci* และ
Staphylococcus aureus ปริมาณสูง อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ใน
จำนวนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มหลักที่พบในปริมาณสูงและมี

E47348

บทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักของหม้า ซึ่งพบในปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 6.0×10^6 , 7.8×10^6 , 5.4×10^6 , 6.4×10^6 และ 1.0×10^7 cfu/g ในตัวอย่างหม้าจากแหล่ง CP1, CP2, KK, MK และ KS ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียนี้ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีโดยอาศัยชุดทดสอบสำเร็จรูป (API 50 CH) พบว่าประกอบด้วย *Lactobacillus curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *Carnobacterium divergens*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus* จากการศึกษาปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียในวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตหม้า พบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถตรวจพบได้ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหม้ามากขึ้นแตกต่างกันไป โดยจะพบมากที่สุด ในไส้ธรรมชาติ (natural casing) ในขณะที่ยีสต์และราพบมากในเนื้อวัว ตับ และมีส่วน *Micrococcaceae* และ enterococci ส่วนใหญ่พบในนม เนื้อวัว ตับและไส้ธรรมชาติ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหม้านำมาคัดเลือกเบื้องต้นโดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC13565, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC25904, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas* sp. และ *Staphylococcus epidermidis* ทดสอบโดยใช้วิธี disc diffusion และตรวจวัดความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC จากผลการศึกษาพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้โดยพบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลทจากจังหวัดชัยภูมิแหล่งที่ 1 ได้แก่ CP105, CP108, CP114, CP115, CP116, CP120, CP124, CP129, CP130, CP131 และ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดชัยภูมิแหล่งที่ 2 ได้แก่ CP210, CP222 และ 4 ไอโซเลท จากจังหวัดมหาสารคาม ได้แก่ MK116, MK112, MK113, MK114 และ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดขอนแก่น ได้แก่ KK111 และ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ KS111, KS105, KS115 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 มากที่สุด ในขณะที่ไอโซเลท CP115, CP116, CP120, CP210, CP213, MK114 และ KS103 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ และเมื่อตรวจวัดความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลท ได้แก่ CP136, CP129, KK114, KK111, CP117, CP130, CP220, KK113, CP131, CP218, CP114, CP210, CP118, CP222, CP120, MK114, KS103 และ CP138 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง (>15 g/l) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ CP116, CP120, CP210, MK114 และ KS103 จากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและความสามารถในการ

E47348

ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง หลังจากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะต่างๆ เช่น การทนกรด อุณหภูมิ น้ำตาล และความเค็ม พบว่าสามารถคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ CP120, CP210 และ MK114 เนื่องจากสามารถเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นของกรดแลคติก และความเค็มได้ดี

แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนำมาศึกษาประสิทธิภาพการหมักร่วมกัน เพื่อเลือกไอโซเลทที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของหมัก และการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักหมัก พบว่าหมักที่ได้จากการทดลองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.62 ถึง 4.66 การสูญเสียน้ำหนักเริ่มต้นที่ 10.18–15.48 % (วันที่ 1) และจะสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็น 54.36–58.33% ในระหว่างกระบวนการหมัก คู่ไอโซเลท CP120 + CP210 ใช้เวลาในการหมักสั้น (7 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยสามารถลดปริมาณของเชื้อ enterococci และ *Staphylococcus aureus* ได้และสามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในทางกลับกันการสร้างกรดอะซิติก จะสร้างได้น้อยกว่าสิ่งทดลองอื่น ปริมาณของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างกรดแลคติก และสามารถลดปริมาณเชื้อ enterococci และ *Staphylococcus aureus* ได้มากกว่าตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามลักษณะทางประสาทสัมผัสของหมักที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อเริ่มต้นได้ผลไม่ต่างจากตัวอย่างควบคุม

Wanee Samappito. 2010. **Characterization, Identification and Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Sausage (Mhom) for their Potential Use as Starter Cultures.** Doctor of Philosophy Thesis in Food Technology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Borwonsak Leenanon,
Prof. Dr. Robert E. Levin

ABSTRACT

E47348

Mhom, Thai traditional fermented sausage, is a popular food mostly consumed in the Northeastern region of Thailand and yet little scientific and technology information is applied in production. These meat products are manufactured with traditional technologies without added starter cultures. Their manufacture depends on the skill and experience of the meat manufacturer rather than technology. Hence, the process depends on the growth of autochthonous microflora which influences the product qualities i.e. flavor, texture, nutritional values, safety, and other characteristics. The isolation and selection of lactic acid bacteria (LAB) which can be used as starter cultures may help in achieving the products with consistent quality, safety and shorter ripening time. Thus, the aims of this study were to isolate and characterize groups of microorganisms from naturally fermented Mhom product. This investigation also intends to characterize and identify the desirable groups of LAB in order to select the most suitable strains, according to their antimicrobial activity against food borne pathogens and large amounts of lactic acid to be used as Mhom starter cultures. Then, the selected LAB in combinations were determined for their fermentation efficiency and the dynamic microbial profiles were also monitored during Mhom fermentation. Mhom samples used for microbial isolation were sampled from five different locations in the Northeastern provinces of Thailand i.e., Chaiyaphum 1 (CP1), Chaiyaphum 2 (CP2), Khon Kaen (KK), Maha Sarakham (MK), and Kalasin (KS) provinces. The results showed high counts of total aerobic plate count, yeast and mould, LAB, *Micrococaceae*, enterococci and *Staphylococcus aureus*. However, *Escherichia coli* O157:H7 was not detected in the products. Obviously, LAB was the main microbial group found in high numbers and had an

E47348

important role in Mhom fermentation. They were found at 6.0×10^6 , 7.8×10^6 , 5.4×10^6 , 6.4×10^6 and 1.0×10^7 cfu/g in Mhoms coded CP1, CP2, KK, MK and KS, respectively. The LAB were further identified based on biochemical tests using API 50 CH and found that they were *Lactobacillus curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *Carnobacterium divergens*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus*. The LAB numbers in the raw materials for Mhom production had also been investigated and found that LAB were observed in all raw materials with population varying in numbers. Particularly, natural casings were found with the highest LAB numbers whereas yeast and mold were mainly found in beef, liver, and spleen. Furthermore, *Micrococcaceae* and enterococci were also mostly found in spleen, beef, liver, and natural casings.

In addition, Mhom isolated LAB were primary screened based on their antimicrobial activities against food spoilage and pathogenic microorganisms including *Staphylococcus aureus* ATCC13565, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC25904, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus epidermidis* using disc diffusion method and organic acid production using HPLC. All the LAB isolates were found to exhibit antimicrobial activities on the indicator bacteria. 10 LAB isolates from Chaiphum 1 (CP105, CP108, CP114, CP115, CP116, CP120, CP124, CP129, CP130 and CP131), 2 isolates from Chaiphum 2 (CP210 and CP222), 4 isolates from Maha Sarakham (MK116, MK112, MK113 and MK114), 1 isolate from Khon Kaen (KK111), and 3 isolates from Kalasin (KS101, KS105 and KS115) exhibited the greatest inhibitory effect on *Escherichia coli* O157:H7 while CP115, CP116, CP120, CP210, CP213, MK14 and KS103 displayed a higher inhibition against *L. monocytogenes* than others. The capability for organic acid production using HPLC was also determined and found that seventeen isolates i.e. CP136, CP129, KK114, KK111, CP117, CP130, CP220, KK113, CP131, CP218, CP114, CP210, CP118, CP222, CP120, MK114, KS103, and CP138 showed the higher production of lactic acid (>15 g/l) compared to the other LAB isolates. Therefore, 5 LAB isolates including CP116, CP120, CP210, MK114 and KS103 were selected based on their broad-spectrum inhibitory activity against

E47348

indicator bacteria and huge production of lactic acid. Afterwards, different cultural conditions were also tested i.e. acid tolerance, temperature, sugar and salt and found that 3 LAB isolates of CP120, CP210, and MK114 were selected based on their ability to grow at high temperature and tolerance to lactic acid and NaCl concentrations.

Finally, those 3 LAB strains were studied in combinations for their fermentation efficiency to achieve the suitable strains for fermentation based on their physical and chemical characteristics and also microbial population changes during Mhom fermentation. It was found that Mhom produced had the pH values ranging from 4.62 to 4.66, weight loss increased from initial values of 10.18–15.48 % (day 1) to 54.36–58.33% during the ripening process. Also, strains of CP120 and CP210 produced highest amounts of lactic acid ($p \leq 0.05$) compared to the other strain combinations and control and took very short period for Mhom fermentation (7 days) compared to control. Besides, they also reduced the numbers of enterococci and *Staphylococcus aureus*. Interestingly, production of acetic acid by these LAB strains was less than the others ($p \leq 0.05$) whereas the populations of LAB increased rapidly compared to the control which was related to the lactic acid production. However, the organoleptic properties were similar between Mhom fermented with starter culture and without starter culture (control).

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Borwonsak Leenanon for his encouragements, guidance, and constructive supervision throughout this study. I am also grateful to my co-advisor, Prof. Dr. Robert E. Levin at University of Massachusetts Amherst, USA who provided support for the work and offered technical advice. His mentorship and encouragements helped me overcome difficult times during the study.

Committee members offered much appreciated advice and support. I would like to extend my sincere thanks to Assoc. Prof. Dr. Singhanat Phoungchandang and Asst. Prof. Dr. Romanee Sanguandeeikul. I was very fortunate to have them on my committee.

I wish to acknowledge the staff at the Department of Food technology, Faculty of Technology, Khon Kaen University for providing excellent facilities and nice working environments for the research.

I would like to gratefully acknowledge the staff of the Food Microbiology Laboratory, Department of Food technology and nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University and scientists at the Laboratory Equipment Center, Mahasarakham University, Thailand, for their collaboration and providing laboratory facilities. Besides, I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Nathanon Trachoo, Department of Food technology and nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Thailand for supplying the excellent facilities and his technical assistance.

Finally, I really appreciate my family for supporting and helping me throughout my life.

Wanee Samappito

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iv
ACKNOWLEDGMENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION	
1. Rationale and Background	1
2. Objectives of the Study	4
3. Scope and Limitation of the Study	4
4. Anticipated Outcomes	4
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	
1. Lactic Acid Bacteria	5
2. Metabolic Activity of Lactic Acid Bacteria	7
3. Identification of Lactic Acid Bacteria	11
4. Molecular Techniques Involved in Identification of Lactic Acid Bacteria	22
5. Lactic Acid Bacteria Benefiting Health	26
6. Mechanisms of Antibiosis Mediated by Lactic Acid Bacteria	31
7. Safety of Lactic Acid Bacteria	33
8. Fermentation of Meat	37
9. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures	48
10. Conclusions and Future Trends	56
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	
1. Sampling, Enumeration and Isolation of the Microorganisms Derived from Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	59

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

		Page
2.	Biochemical, Molecular Characterization and Identification of the LAB Isolated From Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	60
3.	Screening and Application of LAB as the Starter Cultures for Mhom Production	62
4.	Monitoring the Population Dynamics of the Appropriate Starter Cultures During the Fermentation Period	69
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION		
1.	Sampling, Enumeration and Isolation of the Microorganisms Derived from Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	71
2.	Biochemical, Molecular Characterization and Identification of the LAB Isolated from Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	81
3.	Screening and Application of LAB as the Starter Cultures for Mhom Production	95
4.	Monitoring the population dynamic of the appropriate starter cultures during the fermentation period	133
CHAPTER V CONCLUSIONS		
1.	Sampling, Enumeration and Isolation of the Microorganisms Derived from Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	145
2.	Biochemical, Molecular Characterization and Identification of the LAB Isolated from Mhom Produced Locally in the Northeastern of Thailand	146

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3. Screening and Application of LAB as the Starter Cultures for Mhom Production	147
4. Monitoring the Population Dynamic of the Appropriate Starter Cultures During the Fermentation Period	152
REFERENCES	155
APPENDICES	195
APPENDIX A BACTERIAL MEDIA	197
APPENDIX B REAGENTS AND BUFFERS	207
APPENDIX C STANDARD CURVE	211
APPENDIX D QUESTIONNAIRE FOR MHOM PANELISTS	215
APPENDIX E ANALYSIS OF VARIANCE	221
APPENDIX F RESEARCH PUBLICATION	227
CURRICULUM VITAE	245

LIST OF TABLES

		Page
Table 2.1	List of techniques used for the identification of Lactic Acid Bacteria (L: low; M: Moderate; H: High)	12
Table 2.2	List of PCR primers designed for identification and detection of LAB	15
Table 2.3	Selected health-promoting lactic acid bacteria, their impacts and mechanisms	28
Table 2.4	The probiotic effect of lactic acid bacteria (LAB) in human and animal health.	35
Table 2.5	Antimicrobial products of lactic acid bacteria (LAB) with broad inhibitory spectrum	44
Table 2.6	Some commercially used probiotic lactobacilli and bifidobacteria and reported clinical effects in humans	45
Table 2.7	Typical examples of functional starter cultures or co-cultures and their advantages for the food industry	49
Table 3.1	Starter cultures and their combination used in Mhom fermentation	67
Table 4.1	Chemical and microbiological analyses of Mhom samples ($n = 5$) from five different locations in the Northeastern Thailand	75
Table 4.2	LAB strains isolated from Mhom and characterized using the API 50 test	84
Table 4.3	Distribution and species identification based on API 50 CH of LAB isolated from Mhom products collected from five different manufacturing sites in Northeastern Thailand.	85
Table 4.4	List of the isolated LAB strains and degree percentage of their nucleotide identity compared to other sequences of 16S rDNA in the GenBank database	92

LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table 4.5	Microbiological quality of raw materials and ingredients used in Mhom locally produced in Northeast Thailand ($n = 3$)	96
Table 4.6	Diameter of zones of inhibition produced by LAB isolates on the test strains as assessed by the modified disc diffusion method	104
Table 4.7	Broad range tolerance of the five LAB isolates to ranges of temperatures, lactic acid, NaCl concentrations, and pH	112
Table 4.8	Starter cultures and their combination used in Mhom fermentation process	117
Table 4.9	Changes in pH values during the ripening of Mhom	119
Table 4.10	The amounts of lactic acid and acetic acids produced after growth of LAB isolates for 3 and 14 days during the ripening of Mhom	123
Table 4.11	Sensory evaluation of Mhom manufactured with or without the starter culture at the end of the fermentation period	143
Table E1	Analysis of variance for chemical and microbiological analysis of Mhom	223
Table E2	Analysis of variance for microbiological analysis of raw material for Mhom process	224
Table E3	Analysis of variance for sensory evolution results of the sausages manufactured with or without a starter culture at the end of the fermentation	225

LIST OF FIGURES

	Page	
Figure 2.1	Generalized scheme for the fermentation of glucose in lactic acid bacteria	8
Figure 2.2	Generalized scheme for the formation of important metabolic products from pyruvate in lactic acid bacteria	10
Figure 2.3	Interactions during the fermentation of sausages caused by the action of lactic acid bacteria and catalase-positive cocci	38
Figure 4.1	RAPD-PCR patterns of amplified DNA fragments obtained by primer LMPB1 from genomic DNA of 33 representative isolated LAB strains	88
Figure 4.2	RAPD-PCR patterns of amplified DNA fragments obtained by primer LMPB4 from genomic DNA of 33 representative isolated LAB strains	89
Figure 4.3	Dendrogram of 71 isolated LAB strains based on RAPD-PCR analysis with the use of primer LMPB4. The dendrogram was constructed from a distance matrix by using an UPGMA program	91
Figure 4.4	Cluster analysis of the profiles obtained by the homologous sequence analysis of 16S rDNA of the isolated LAB strains utilizing the BLAST program	93
Figure 4.5	Inhibitory zone of cell-free supernatant and neutralized culture supernatant (+) against pathogenic bacteria, including <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Enterococcus faecalis</i> , and <i>Salmonella typhi</i>	103
Figure 4.6	Concentrations of lactic acid (g/l) in the supernatants from the overnight-grown cultures of LAB isolates	108
Figure 4.7	An HPLC chromatogram of lactic acid and acetic acid standards, and lactic acid and acetic acid productivity of some LAB isolates	109

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 4.8	Growth of three LAB isolates, i.e., CP120 (●), CP210 (○) and MK114 (▼), over 60 h. The isolates were cultured in the MRS broth (pH 7.0) and incubated at 37°C under non-controlled pH without agitation.	114
Figure 4.9	Lactic acid produced by three LAB isolates, CP120 (●), CP210 (○) and MK114 (▼), over 60 h. The isolates were cultured in MRS broth (pH 7.0) and incubated at 37°C under non-controlled pH condition without agitation.	115
Figure 4.10	pH of the cultures of three LAB isolates, i.e., CP120 (●), CP210 (○) and MK114 (▼), over 60 h. The isolates were cultured in MRS broth (pH 7.0) and incubated at 37°C under non-controlled pH condition without agitation.	115
Figure 4.11	Glucose consumption (mg/l) by three LAB isolates, i.e., CP120 (●), CP210 (○) and MK114 (▼) over 60 h.	116
Figure 4.12	Evolution of the pH levels over time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	119
Figure 4.13	Percentages of weight loss over time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	120
Figure 4.14	Changes in the glucose levels over time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	121
Figure 4.15	The chromatogram of lactic acid obtained during the time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	124
Figure 4.16	The concentrations of lactic acid produced during the time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	126

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 4.17	LAB count (log CFU/g) during the time period of fermentation of Mhom production using different starter cultures	127
Figure 4.18	Total aerobic plate count (log cfu/g) obtained during the ripening period of Mhom production using different starter cultures	128
Figure 4.19	Micrococcaeae count (log CFU/g) obtained during the ripening period of Mhom production using different starter cultures	129
Figure 4.20	Enterococci count (log cfu/g) obtained during the ripening period of Mhom production using different starter cultures	131
Figure 4.21	Yeast and molds count (log cfu/g) obtained during the ripening period of Mhom production using different starter cultures	132
Figure 4.22	<i>Staphylococcus aureus</i> count (log cfu/g) obtained during the ripening period of Mhom production using different starter cultures	133
Figure 4.23	Percentage of weight loss observed during the time period of fermentation of Mhom production with and without using starter cultures (<i>L. plantarum</i> CP120 + <i>L. plantarum</i> CP210)	135
Figure 4.24	HPLC Chromatogram of lactic acid obtained during the time period of fermentation of Mhom production with and without using the starter cultures (<i>L. plantarum</i> CP120 + <i>L. plantarum</i> CP210)	137
Figure 4.25	Changes in lactic acid concentrations and glucose consumption over the time period of fermentation of Mhom production with and without using the starter cultures (<i>L. plantarum</i> CP120 + <i>L. plantarum</i> CP210)	138

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 4.26	139
Changes in pH values and LAB counts over the time period of fermentation of Mhom production with and without using the starter cultures (<i>L. plantarum</i> CP120 + <i>L. plantarum</i> CP210)	
Figure 4.27	141
Changes in total aerobic plate count, enterococci, <i>Micrococcaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , yeast and mold counts during fermentation of Mhom with starter cultures (<i>L. plantarum</i> CP120 + <i>L. plantarum</i> CP210) and control (no starter cultures added).	

LIST OF ABBREVIATIONS

%	Percent
°C	Degree Celcius
µg	Microgram
µl	Microliter
ATCC	American type culture collection
AU/ml	Arbitrary unit per milliliter
BHI	Brain heart infusion
bp	Base pair
CFU/ml	Colony forming unit per milliliter
cm	Centimeter
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FDA	Food and drug administration
g	Gram
GRAS	Generally recognized as safe
h	Hour
LAB	Lactic acid bacteria
M	Molar
mg/ml	Milligram per milliliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD-PCR	Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction
rpm	Round per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
UV	Ultraviolet
W	Watt