M.Sc. thesis abstract

Bio-Functionality of Peptides Derived from Milk Proteins during Fermentation by Some Lactic Acid Bacterial Isolates

Nissma Waheed Awad Abo Koriesh, Gaber Ali Hassan El-Baradei, Ehab Essa Kheadr, Noha El-sayed Dyab

Department of Dairy Science and Technology, Faculty of Agriculture, Alexandria University

ABSTRACT

The objectives of this study were mainly directed to isolate and molecularly identify some lactic acid bacterial strains from milk and some Egyptian dairy products, and to study their ability to produce proteolytic activities to obtain bioactive peptides with antimicrobial, anti-diabetic, and antioxidant activities. These identified bioactive strains were evaluated for technological and safety standards and used in the production of high-quality and healthy Karish cheese. The study was divided into 3 parts:

Part 1: Isolation and identification of lactic acid bacterial strains:

a) Primary isolation of lactic acid bacteria strains:

One hundred and sixty-six different samples of Egyptian dairy products were collected from ten different Egyptian governorates, including buffalo, cow, sheep, camel milk, Karish, Domiati, Ras, and mish cheeses. These samples were collected. It was possible to isolate 634 isolates that were probable lactic acid bacteria.

b) Screening of Lactic Acid Bacteria for proteolytic activity:

The results indicated that 179 out of 634 isolates had proteolytic activity, and 455 isolates were negative in terms of proteolytic activity.

c) Screening of Lactic Acid Bacterial strains with proteolytic activity according to some technological criteria:

One hundred and seventy-nine Isolates were subjected to some technological standards such as acid production and production of exopolysaccharides, in addition to their proteolytic activity. The results indicated that 39 out of 179 isolates had the highest proteolytic activity, and 32 strains had a high ability to produce acid. Based on these two traits, eight isolates were selected to undergo the sequencing strategy.

d) Molecular identification of the selected strains:

The eight isolates were identified by sequencing method using the 16S rDNA gene and it was found that the isolates belong to the following species (or subspecies):

Lactobacillus rhamnosus (FFNL1308), *Lactococcus lactis* (FFNL1940), *Lactococcus lactis* (FFNL1969), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis bv diacetylactis* (FFNL2005), *Pediococcus acidilactici* (FFNL2062), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (FFNL4041), *Lactiplantibacillus plantarum* (FFNL4621) and *Weissella confusa* (FFNL4939).

Part 2: Antimicrobial Activity, Assessment of Biological Activity (In vitro), and Safety Traits of Identified LAB Strains:

a) Factors affecting antimicrobial activity:

Most of the eight isolates showed full or partial antimicrobial activity for the following seven pathogens: *Escherichia coli* ATCC 8739, and ATCC 23235, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and *Candida albicanis* ATCC 10231, *Listeria monocytogenes* ATCC 679 and *Bacillus cereus* ATCC 10987.

Some factors were studied in the antimicrobial activity of isolates such as heat treatment, pH, and the effect of proteolytic enzymes. The results indicated that the cell-free extract of isolates can withstand completely or partially in front of the used heat treatments, pH values , and the proteolytic enzymes used.

b) Evaluation of biological activity (anti-diabetic activity and anti-oxidant activity):

The cell-free extract of isolates was found to have anti-diabetic activity by inhibiting the α-amylase enzyme. Inhibition rates ranged between 2.48 - 97.38%.

It was also found that the extract of cell-free isolates has anti-oxidant activity, and DPPH was used, which reached a percentage of antioxidant activity between 7.42-23.90%. ABTS was used, and the percentage of antioxidant activity ranged between 14.45-73.61%. The substance FRAP was also used, and the values of the antioxidant activity ranged between 79.78 and 359.12.

c) Safety standards for isolates of lactic acid bacteria that have been identified:

The eight isolates were tested for sensitivity to 14 types of antibiotics. The results indicated that the isolates varied in terms of resistance and sensitivity. It was found that the strain *Lb. plantarum* FFNL4621 is sensitive to

12 antibiotics and resistant to 2, while the strain *Lc. Lactis* FFNL1940 and the strain *W. confusa* were sensitive to 9 and resistant to 5 antibiotics.

Other safety features have been used such as hydrolysis of gelatin, DNA, or hemolysis, as well as the ability to produce amines (histamine). The results indicated that all eight strains did not show any ability to hydrolyze gelatin and DNA. And they weren't able to produce histamine.

Part 3: Conclusion:

1- The Egyptian dairy products are rich in lactic acid bacteria.
2- 28% of the isolated lactic acid bacterial strains had proteolytic activity.
3- About 22%, 18% and 8% of the previous strains have excellent technological properties in terms of very high proteolytic activity, acid production and exopolysaccharide production, respectively.
4- The eight best strains in terms of technological properties were identified by nucleotide sequencing method.
5- The identified strains showed (in vitro) health benefits in terms of antimicrobial activity, antidiabetic activity, and antioxidant activity.
6- The recognized strains have proven to be safe in terms of safety standards.
7- The use of lactic acid bacterial strains in the manufacture of Karish cheese gained health benefits in terms of antimicrobial activity, antidiabetic activity, and antioxidant activity.
8- It is recommended to use two groups of lactic acid bacteria strains in the manufacture of Karish cheese:

K1 (Lb. rhamnosus FFNL1308, Lc. Lactis FFNL1940 + Lc. Lactis FFNL1969)

K3 treatment (Lb. rhamnosus FFNL1308 + Lc. Lactis FFNL1940+ Lb. plantarum FFNL4621). . It surpassed the rest of the transactions in terms of health benefits and cheese quality.

الملخص

الوظائف الحيوية للببتيدات المشتقه من بروتينات اللبن أثناء التخمر بواسطة بعض عزلات بكتيريا حامض اللاكتيك

كانت أهداف هذه الدراسة موجهة بشكل أساسي إلى عزل بعض سلالات بكتيرية حمض اللاكتيك من الألبان ومنتجات الألبان المصرية والتعرف عليها جزيئيًا ، ودراسة نشاطها المحلل للبروتين للحصول على الببتيدات النشطة بيولوجيًا ذات الأنشطة المضادة للميكروبات ومرض السكري النوع الثاني ومضادات الأكسدة، ثم تقييم هذه السلالات النشطة بيولوجيًا وفقًا للمعايير التكنولوجية والسلامة واستخدامها في إنتاج جبن قريش عالي الجودة وصحي. تم تقسيم الدراسة إلى ٣ أجزاء:

الجزء الأول: عزل والتعرف على سلالات حمض اللاكتيك البكتيرية:

أ) العزل الأولي لسلالات بكتيريا حمض اللاكتيك:

تم جمع ١٦٦ عينة مختلفة من الألبان ومنتجات اللبنية المصرية اشتملت العينات على اللبن الجاموسي والبقري ولبن الغنم ولبن الناقة والاجبان القريش والدمياطي والراس والمش والقشدة وقد جمعت هذه العينات من عشر محافظات مصرية مختلفة. كانت العزلات إما كرويات أو عصويات موجبة لصبغة الجرام وسالبة للكتاليز. وقد تم عزل ٦٣٤ عزلة محتمل كونها بكتيريا حمض اللاكتيك.

ب)فحص عزلات بكتيريا حمض اللاكتيك للتحقق من نشاطها المحلل للبروتين:

اشارت نتائج الفحص الى وجود ١٧٩ عزلة من ٦٣٤ الى امتلاكها نشاطا محللاً للبروتين وان ٤٥٥ عزلة كانت سالبة لذلك النشاط.

ج) فحص عزلات بكتيريا حمض اللاكتيك ذات القدرة التحليلية للبروتين وفقًا لبعض المعايير التكنولوجية:

تم دراسة العزلات لبعض المعايير التكنولوجية لل ١٧٩ عزلة مثل انتاج الحامض وانتاج عديدات التسكر (Exopolysaccharides) اضافة لما تملكه تلك العزلات من نشاط محلل للبروتين. وقد اشارت النتائج الى أن ٣٩ عزلة من ١٧٩ هي الأعلى نشاطاً لتحليل البروتين وأن ٣٢ سلالة لها قدرة عالية على انتاج الحامض. وبناءاً على هاتين الصفتين فقد تم اختيار ثماني عزلات للتعرف الجزيئي بطريقة التتابع النيوكلوتيدي (Sequencing).

د) التعرف الجزيئي على لسلالات المختارة:

تم التعرف على العزلات الثمانية بطريقة الـــ Sequencing باستخدام جين 16S rDNA . ووجد ان العزلات تنتمـــي للانواع (أو تحت نوع) الآتية:

Lactobacillus rhamnosus (FFNL1308), *Lactococcus lactis* (FFNL1940), *Lactococcus lactis* (FFNL1969), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis bv diacetylactis* (FFNL2005), *Pediococcus acidilactici* (FFNL2062), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (FFNL4041), *Lactiplantibacillus plantarum* (FFNL4621) and *Weissella confuse* (FFNL4939).

الجزء الثاني: النشاط المضاد للميكروبات وتقييم النشاط البيولوجي (في المختبر) ومعايير السلامة لعزلات بكتيريا حمض اللاكتيك التي تم التعرف عليها :

أ) النشاط المضاد للميكروبات والعوامل المؤثرة عليه:

أظهرت معظم العزلات الثمانية نشاطاً مضاداً للميكروبات السبعة الآتية بصورة كاملة أو جزئيـــة *Escherichia coli* ATCC 8739, and ATCC 23235, *Salmonella Typhimurium ATCC 14028, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and *Candida albicanis* ATCC 10231, *Listeria monocytogenes* ATCC 679 and *Bacillus cereus* ATCC 10987.

تم دراسة بعض العوامل على نشاط العزلات المضاد للميكروبات مثـــل المعاملـــة الحراريـــة ،للـــ pH وتـــأثير الانزيمات المحللة للبروتين. وقد اشارت النتائج الى ان مستخلص العزلات الخالي من الخلايا يستطيع التحمـــل كليـــاً أو جزئياً امام المعاملات الحرارية المستخدمة وقيم الـــ pH والانزيمات المحللة للبروتين المستخدمة.

ب)تقييم النشاط البيولوجي (النشاط المضاد لمرض السكري النوع الثاني والنشاط المضاد للأكسدة):

وجد ان مستخلص العزلات الخالي من الخلايا له نشاط مضاد لمرض السكري النوع الثاني عن طريق تثبيط انـــزيم الالفا–اميليز (α-amylase). وقد تراوحت نسب التثبيط بين ٢.٤٨– ٩٧.٣٨٪.

وجد ايضا أن مستخلص العزلات الخالي من الخلايا له نشاط مضاد للاكسدة وقد استخدم لذلك مـــادة DPPH التـــي بلغت نسبة النشاط المضاد للأكسدة بين ٧.٤٢–٢٣.٩٠٪. واستخدمت مادة ABTS وبلغت نسبة النشاط المضاد للأكسدة بين ١٤.٤٥–٧٣.٦١٪ . كما استخدمت مادة FRAP وبلغت قيم النشاط المضاد للأكسدة بين ٧٩.٧٨ – ٣٥٩.١٢ .

ج) معايير السلامة لعزلات بكتيريا حمض اللاكتيك التي تم التعرف عليها:

تم اختبار العزلات الثمانية للحساسية تجاة ١٤ نوعاً من المضادات الحيوية. وقد اشارت انتائج الى تفاوت العزلات مـــن حيث المقاومة والحساسية فقد وجد ان السلالة *Lb. plantarum* FFNL4621 حساسة لعدد ١٢ مضاد حيـــوي ومقاومـــة لنوعين، بينما السلالة *Lc. Lactis* FFNL1940 والسلالة *W. confusa* حساستين لعدد ٩ مضاد حيوي ومقاومة لخمســـة انواع.

استخدمت سمات أمان أخرى مثل تحليل الجيلاتين أو الحمض النووي أو تحلل الدم، وكـــذلك القـــدرة علـــى إنتـــاج الأمينات (الهيستامين). وقد أشارت النتائج إلى أن جميع السلالات الثمانية لم تظهـــر أي قـــدرة علـــى التحلـــل المـــائي للجيلاتين اوالحمض النووي. ولم تتمكن من إنتاج الهيستامين.

الجزء الثالث: استخدام وتطبيق سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك الثمانية في تصنيع الجبن القريش:

أ) اختبار التعايش بين السلالات:

تم دراسة امكانية التعايش بين السلالات الثمانية. وبحسب النتائج، لم يكن هناك اي تعارض بين السلالات المعزولة ، بحيث يمكنهم التعايش في نفس بيئة الجبن.

ب)اعداد تشكيلات من السلالات للاستخدام في تصنيع الجبن القريش:

بعد اجراء تجارب مبدئية تم عمل ست مجموعات من السلالات (كل مجموعة تتكون من ثلاث سلالات) تتكرر فـــي كل مجموعة السلالتين الآتيتين:

Lb. rhamnosus FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940

تم بعد ذلك تصنيع ست معاملات للجبن القريش. وكانت مجموعات السلالات الستة المستخدمة في تصنيع معاملات الجبن القريش (K1, K2, K3, K4, K5 and K6) كما يلي:

1-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *Lc. Lactis* FFNL1969 (K1)
2-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *Lc. Lactis* subsp. *lactis bv diacetylactis* FFNL2005 (K2)
3-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *Lb. plantarum* FFNL4621 (K3)
4-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *Pd. Acidilactici* FFNL2062 (K4)
5-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *Lc. Lactis subsp lactis* FFNL4041 (K5)
6-*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 + *W. confusa* FFNL4939 (K6)

ج) الكشف عن النشاط البيولوجي للسلالات في الجبن القريش:

أشارت النتائج ان هناك نشاطاً مضادا لمرض السكري من النوع الثاني (تثبيط انزيم الالفا اميليز) بالجبن نتيجة لنمو السلالات وتراوحت نسبة التثبيط بين ٦.٣٧ – ٩٧.٢٩٪ وذلك في الجبن الطازج ، بينما كانت النسبة في نهاية فترة التخزين بين ٤.٥٨ – ٨٥.٨٧٪.

ايضاً وجد نشاطا فعالاً مضاداً للاكسدة نتيجة استخدام تللك السلالات في تصنيع الجبن القريش.

د) التحليل الكيماوي للجبن:

اشارت نتائج التحليل الكيماوي إلى ان نسب الرطوبة ، البروتين ، الحموضة وقيمة الـــ pH تراوحت بين (٧٢.١٩ –٧٧.٥٥) ، (١٣.٨٦– ١٦.٥٠) ، (١.٥١ –١.٦٧) و (٤.٥٨ – ٤.٧٠) للجبن الطازج على الترتيب. وقد تغيـــرت هذه القيم قليلاً في نهاية فترة التخزين.

هـــ)التحليل الميكروبيولوجي للجبن:

اشارت نتائج التحليل الميكروبيولوجي الى ان الاعداد الكلية للبكتيريا واعداد اللاكتوكواي واعـــداد اللاكتوباســـيلاي (log CFU/g) لمعاملات الجبن القريش الستة تراوحت بين (٤.٥٣–٣.٥٦)، (٤.٤٧–٤.٣٧) و(٤.٤٦–٤.٠٩) للجـــبن الطازج على الترتيب. وقد تغيرت هذه القيم قليلاً في نهاية فترة التخزين. من ناحية اخرى، لم تظهر أي نموات لبكتيريا الكوليفورم أو الفطريات والخمائر في جميع معاملات الجبن القريش ، باستثناء نهاية فترة التخزين لمعاملتي الجبن K5 ، K6 حيث ظهر نمو للفطريات والخمائربأعداد محدودة جداً.

و) التقييم الحسي للجبن:

اشارت النتائج الى تفوق المعاملتين (K1, K3) عن باقي المعاملات من حيث سمات التقييم الحسي. وهذا يشير الـــى تفوق مجموعة سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك في المعاملة K1 (*Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940) والمعاملـــة K3 (*Lc. Lactis* FFNL1969 + *Lb. plantarum* + *Lb. rhamnosus* FFNL1308, *Lc. Lactis* FFNL1940 FFNL4621). لذا نوصي باستخدام هاتين المجموعتين من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك في تصنيع الجبن القريش في ظل الظروف المحلية لما تضيفه تلك التشكيلة من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك الى هذا المنتج اللبنـــي مـــن صـــفات عالية الجودة بجانب المميزات الصحية المضافة للجبن القريش.

الجزء الثالث: الاستنتاج:

١– ان المنتجات اللبنية المصرية غنية ببكتيريا حمض اللاكتيك.

٢– ان ٢٨٪ من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة امتلكت نشاطاً محللاً للبروتين.

٣– ان حوالي ٢٢٪ ، ١٨٪ و ٨٪ من السلالات السابقة لها خواص تكنولوجية ممتازة من حيث النشاط العـــالي جـــدا لتحليل البروتين وانتاج الحامض وانتاج عديدات التسكر على الترتيب.

٤– تم التعرف على افضل ثماني سلالات من حيث الخواص التكنولوجية بطريقة التتابع النكليوتيدي.

٥- اثبتت السلالات المتعرف عليها فوائد صحية (in vitro) من حيث النشاط المضادا للميكروبات والنشـــاط المضـــاد للسكري والنشاطا المضادً للاكسدة.

٦- اثبتت السلالات المتعرف عليها انها آمنة من حيث معايير السلامة.

٧- اكسب استخدام سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك في تصنيع الجبن القريش فوائد صحية من حيث النشـــاط المضـــاد للميكروبات والنشاط المضاد للسكري والنشاط المضاد للاكسدة.

٨- ينصح باستخدام المجموعتين من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك في تصنيع الجبن القريش:

K1 (Lb. rhamnosus FFNL1308, Lc. Lactis FFNL1940 + Lc. Lactis FFNL1969)

K3 (Lb. rhamnosus FFNL1308 + Lc. Lactis FFNL1940+ Lb. plantarum FFNL4621)

حيث تفوقت على باقي المعاملات من حيث الفوائد الصحية وجودة الجبن.