RECYCLING OF SOME INDUSTRIAL WASTES TO PRODUCE ENZYMES BY FERMENTATION

By

EMAD MOHAMED ALY YOUSEF

B.Sc. (Food Technology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1989
M.Sc. (Food Technology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1998

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Microbiology)

Department of Microbiology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009

SUPERVISION SHEET

RECYCLING OF SOME INDUSTRIAL WASTES TO PRODUCE ENZYMES BY FERMENTATION

Ph.D. Thesis
By

EMAD MOHAMED ALY YOUSEF

B.Sc. (Food Technology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1989
M.Sc. (Food Technology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1998

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. REFAE IBRAHIM REFAE
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ISMAIL HOSNY ALI HOSNY
Late Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MOAWAD KAMEL ZAHRA
Late Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. HUSSEIN AZZAZ ABD EL-FATAH
Researcher Professor of Dairy Sci. Tech., NRC, Dokki, Egypt

تدوير بعض المخلفات الصناعية لإنتاج الإنزيمات بإستخدام التخمر

رسالة مقدمة من

عماد محمد على يوسف

بكالوريوس العلوم الزراعية (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٨٩
ماجستير العلوم الزراعيـــة (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٩٨

للحصول على

درجة دكتوراه الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

قســـــم الميكروبيولوجيا الزراعية
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٩

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks; to my dear father (may God bless his sole), my mother, my dear wife and my two beloved sons Mohamed and Mahmoud for every thing.

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : الزراعة القسم : الميكروبيولوجيا الزراعية

١ - **الدرجة العلمية** : ماجستير [ ] دكتوراه [√]

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

تدوير بعض المخلفات الصناعية لإنتاج الإنزيمات بإستخدام التخمر

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

Recycling of Some Industrial Wastes to Produce Enzymes by Fermentation

التخصص الدقيق :

تاريخ المناقشة : **٢٠٠٩/٥/٢٦**

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : **عماد محمد على يوسف** الجنسية : **مصرى** النـوع : **ذكر**

العنوان : **١٤ شارع كمال هويدى-مدينة الفنون-الهرم-الجيزة-مصر**

رقم التليفون :٠١٠١٦٤٥٦١٣

جهة العمل :**مكتب الالتزام البيئى-اتحاد الصناعات المصرية**

رقم الفاكس :**٠٢-٢٣٩٠٤٨١٦** البريد الإلكترونى : **emadaly68@yahoo.com**

٤ - المشرفون على الرسالة :

	الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١.	أ. د. رفاعى ابراهيم رفاعى	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة
٢.	أ. د. اسماعيل حسنى على حسنى	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة
٣.	أ. د. معوض كامل زهرة	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة
٤.	أ. د. حسين عزاز عبد الفتاح	علوم الالبان	المركز القومى للبحوث	---

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

تم اختبار سبعة سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك لانتاج انزيم البيتاجالاكتوسيديز وتم اختيار *S. thermophilus* والتى تم دراسة تنميتها على افضل تركيب لبيئة البرمييت وكذا افضل الظروف البيئية لتحقيق اعلى انتاج من البيتاجالاكتوسيديز بمقدار ٧.٨٥وحدة/مل. باجراء التنقية الجزئية للانزيم باستخدام كبريتات الامونيوم بتركيز ٨٥% وجد ان نشاط الانزيم تضاعف بمقدار ٨.٣٤ مرة. وتم دراسة خصائص حركيات الانزيم باستخدام ONPG. واستخدم المستخلص الانزيمى الخام لانتاج البرمييت منخفض اللاكتوز بنسبة ٦٠% وتحضير مشروب فراولة البرمييت منه حيث لاقى هذا المشروب قبولا اكثر لدى المحكمين عن مثيليه تحت الاختبار.

(**الكلمات الدالة** : انزيم البيتاجالاكتوسيديز، برمييت، تدوير، بكتريا حامض اللاكتيك، ستربتوكوكس ثرموفيليس، لاكتوباسيليس روترى، حركيات الانزيم، البرمييت منخفض اللاكتوز، مشروب البرمييت)

٥ ـ ٢ باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

Seven LAB strains were chosen to study its ability to produce β-galactosidase. *S. thermophilus* was cultivated in permeate based medium under optimum conditions and the highest enzyme activity was 7.85 U/ml. The enzyme activity increased by 8.34 folds after partial purification and the kinetics was studied using ONPG. The enzyme crude extract was used to produce low-lactose content permeate by 60% and producing a good quality strawberry permeate beverage.

(Key Words : β-Galactosidase, permeate, recycling, lactic acid bacteria (LAB), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus reuteri*, enzyme kinetics, low-lactose permeate, permeate-beverage**)**

٦ - **<u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u>** :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ - ١ امكانية استخدام البرمييت الناتج من مصانع انتاج الجبن بالترشيح الفائق فى انتاج انزيم البيتاجالاكتوسيديز

٦-٢ استخدام انزيم البيتاجالاكتوسيديز فى خفض محتوى اللاكتوز فى البرمييت بنسبة ٦٠% للتغلب على مشكلة التخلص الغير امن منه

٦-٣ امكانية استخدام البرمييت المنخفض اللاكتوز فى انتاج مشروب فراولة منخفض اللاكتوز ويفيد مجموعة من المستهلكين الذين يعانون من عدم قابلية هضمه.

٧ – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٧ – ١ مصانع انتاج الجبن بالترشيح الفائق

يمكن من خلال هذا البحث التغلب على مشكلة التخلص الغير امن للمخلفات السائلة فى مصانع انتاج الجبن بالترشيح الفائق مما يعطى الفرصة لهذه الصناعات للتوافق مع القوانين البيئية المصرية

٧ – ٢ مصانع انتاج العصائر

يمكن لمصانع انتاج العصائر انتاج نوع جديد من المشروبات باستخدام البرمبيت الناتج من مصانع انتاج الجبن بالترشيح الفائق حيث يعتبر هذا البرمبيت مادة خام رخيصة الثمن وخفض تكلفة انتاج العصائر نتيجة الوفر فى كمية السكر المضافة اليه اعتماداً على سكر الجلوكوز الناتج من التحلل المائى للسكروز بانزيم البيتاجالاكتوسيديز.

٧ – ٣ مصانع انتاج الالبان

يمكن انتاج بعض انواع الالبان المتخمرة المنخفضة محتوى سكر اللاكتوز تهدف الى التغلب على مشكلة فئة معينة من المستلكين الذين يعانون من مشكلة عدم القدرة على هضم سكر اللبن (اللاكتوز).

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** [√] **لا** [ ]

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ اتحاد الصناعات المصرية بالقاهرة

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى [ ]

تعاون أكاديمى [ ]

مشروع ممول من جهة ثالثة [ ] (اذكر ما هى :)

أخرى [√] (منسق قطاع الصناعات الغذائية–مكتب الالتزام البيئى–اتحاد الصناعات المصرية)

٩ - <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

لا ☐ **(لماذا)**

نعم ☑

(I) لتطبيق البحث : ☑

(II) لاستكمال البحث : ☑

(ج) أخرى ☐ **(تذكر)**

١٠ - <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

١٠ - ١ مجلة العلوم الزراعية-جامعة المنصورة-مجلد ٣٣ رقم (٩)-سبتمبر ٢٠٠٨

١١ - <u>هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع</u> (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

١٢ - <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم ☑ لا ☐

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

-

-

-

-

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

تدوير بعض المخلفات الصناعية لإنتاج الإنزيمات بإستخدام التخمر

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

عماد محمد على يوسف

بكالوريوس العلوم الزراعية (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٨٩
ماجستير العلوم الزراعيـــة (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٩٨

لجنة الإشراف

الدكتور/ رفاعي إبراهيم رفاعي
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ اسماعيل حسنى على حسنى
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ معوض كامل زهرة
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ حسين عزاز عبد الفتاح
أستاذ علوم الألبان- المركز القومى للبحوث- الدقى - القاهرة

تدوير بعض المخلفات الصناعية لإنتاج الإنزيمات بإستخدام التخمر

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

عماد محمد على يوسف

بكالوريوس العلوم الزراعية (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٨٩
ماجستير العلوم الزراعيـــة (صناعات غذائية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٩٨

لجنة إجازة الرسالة:

د. جابر زايد بريشة.....

أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية– كلية الزراعة– جامعة المنيا

د. حسين عزاز عبد الفتاح.....

أستاذ باحث بقسم علوم الألبان - المركز القومي للبحوث – الدقى – مصر

د. إنصاف إمام داود.....

أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية– كلية الزراعة– جامعة القاهرة

د. رفاعي إبراهيم رفاعي.....

أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية– كلية الزراعة– جامعة القاهرة

Name of Candidate: Emad Mohamed Aly Yousef **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Recycling of Some Industrial Wastes to Produce Enzymes by Fermentation
Supervisors: Dr. Refae I. Refae, Dr. Ismaeil H.A. Hosni, Dr. Moawad K. Zahra and Dr. Hussein A. Abd El-Fatah
Department: Microbiology Dv.
Branch: **Approval: 26 / 5 / 2009**

ABSTRACT

The main objective of the present study was to select bacterial strains capable to produce β-galactosidase enzyme and to maximize its productivity by optimizing growth conditions by which suitable amounts of the produced enzyme could be used to treat permeate which in turn can be utilized in the production of low-lactose content beverages.

From seven lactic acid bacterial strains (LAB) *S. thermophilus* and *L. reuteri* were chosen representing both bacilli and cocci forms producing β-galactosidase after test growth on synthetic MRS and M17 broth, recording 10.01 and 10.44 U/ml (using ONPG), respectively. Studying the permeate-based medium composition and the environmental conditions for highest β-galactosidase production revealed that *L. reuteri* and *S. thermophilus* gave 5.56 and 7.11 U/ml when grown on their media containing lactose 4.5%, KH_2PO_4:K_2HPO_4, at ratio of 0.5:0.5 g/L, initial pH at 6.5, ammonium phosphate at 0.66 mg N/L as nitrogen source. Following that, the optimum incubation temperature for both strains was found to be 30˚C and 35˚C recording 6.31 and 7.85 U/ml, respectively.

The *S. thermophilus* gave its maximum β-galactosidase production of 377.073 U/mg protein (5.28 U/ml) after 16 hrs of incubation at 35˚C near the end of exponential phase. The partially purified enzyme separated at 85% ammonium sulfate gave the highest purification folds of 8.34 and was successfully used to study the kinetic characteristics of the enzyme using ONPG as a substrate. The obtained K_m from Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk and Hanes-Woolf were 6.650, 6.786 and 8.670, respectively, while the V_{max} values were 76.00, 102.04 and 108.38, respectively. The optimum pH and temperature determined for the enzyme activity were found to be 7.2 and 37˚C recording 51.5 and 44.5 U/ml, respectively. The heat stability test of the partially purified enzyme at 70˚C recorded that the enzyme half life time was found to be between 6-8 minutes at which it retained 50% of its activity, while it retained about 25% of its activity at 70˚C after 24 minutes.

The produced β-galactosidase crude extract used to treat permeate, converted 60% of the lactose content at 37˚C after 225 minutes and the resulting low-lactose permeate was used in the preparation of strawberry-permeate beverage. This beverage was evaluated organoleptically by taste-panel compared with the untreated and natural manufactured strawberry juice obtained from the local market and no differences were detected between the three treatments in respect to flavor and appearance, while the treated permeate was found to be much acceptable in color than the other strawberry beverages.

Keywords: β-Galactosidase, permeate, recycling, lactic acid bacteria (LAB), *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus reuteri,* enzyme kinetics, low-lactose permeate, permeate-beverage

ACKNOWLEDGEMENT

Praise and thanks are to mighty ***God*** *, the most merciful for assisting and directing me always to the right way.*

A worm of gratitude is devoted to the sole of ***Dr. Moawad Kamel Zahra*** *and* ***Dr. Ismail Hosney Ali****, Late Professors of Microbiology, Fac. Agric., Cairo Univ. and for taking the responsibility of supervising this work. Their valuable and endless knowledge crownd with their patience virtue and encouragement have helped me always throughout my whole experience and I will always be proud to be their student.*

A worm of gratitude is devoted to ***Dr. Refae Ibrahim Refae****, Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo Univ., for taking the responsibility of supervising this work. His valuable and endless knowledge crownd with his patience virtue and encouragement have helped me always throughout my whole experience and I will always be proud to be his student.*

I would like to express my deep thanks and ultmost gratitude to ***Dr. HUSSEIN AZZAZ ABD EL-FATAH****, Researcher Professor of Dairy Science, National Research Center, for proposing the research program and plan of study, for his sincere supervision and for giving every possible help and advice he could throughout this work.*

My gratitude is due to the whole ***Dr. Khayria Naguib*** *and all the staff members of Mycotoxins Central Lab., NRC for offering all the needed facilities and for their endless suplementation of knowledge, valuable advices, encouragement and guidance offered through my whole scientific career.*