STUDIES ON THE PRODUCTION OF POLYSACCHARIDES FROM LACTIC ACID BACTERIA

By

SAHAR HASSAN SALAH MOHAMED

B.Sc. Agric. (Dairy Sciences), Cairo University, 1990
M.Sc. Agric. (Dairy Sciences), Cairo University, 2000

Thesis

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Doctor of Philosophy

In
Agricultural Microbiology

Department of Agriculture Microbiology
Faculty of Agriculture
Cairo University

2006

Cairo University
Faculty of Agriculture
Department of Agric. Microbiology

APPROVAL SHEET

Ph.D. Thesis approved by:
Name: Sahar Hassan Salah Mohamed
Title : Studies on the Production of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria

Degree: Ph.D. Agricultural Microbiology.

Approved by:

Prof. Dr. Narges M. H. EL-Said _____
Professor of Dairy Microbiology
Dept. of Dairy Sci.
National Research Center.

Prof. Dr. Mohammed Fayez Fouad _____
Professor of Agric. Microbiology
Dept. of Agric. Microbiology
Faculty of Agric., Cairo Universty.

Dr. Refae Ibrahim Refae _____
Associate Prof. of Agric. Microbiology
Dept. of Agric. Microbiology
Faculty of Agric., Cairo Universty.

Prof. Dr. Hussein Azzaz Murad _____
Professor of Dairy Microbiology
Dept. of Dairy Sci.
National Research Center.

Committee in charge
Date: / / 2006

STUDIES ON THE PRODUCTION OF POLYSACCHARIDES FROM LACTIC ACID BACTERIA

By

SAHAR HASSAN SALAH MOHAMED

B.Sc. Agric. (Dairy Sciences), Cairo University, 1990
M.Sc. Agric. (Dairy Sciences), Cairo University, 2000

Under the Supervision of

Dr. Refae Ibrahim Refae
Associate Prof. of Agric. Microbiology
Dept. Agric., Microbiology
Faculty of Agric. Cairo Universty.

Prof. Dr. Hussein Azzaz Murad
Professor of Dairy Microbiology
Dept. Dairy Sci.
National Research Center.

2006

ABSTRACT

Two hundred and ten lactic acid bacterial cultures were isolated from 120 samples of different types of raw milk, traditional Egyptian fermented milk, cheese and butter. Isolates were screened visually on the basis of colony ropiness for exopolysaccharides (EPS) production on modified MRS agar medium containing glucose, sucrose, fructose, maltose or lactose. Among the 210 isolates tested, 16 (7.6%) exhibited potential activity for EPS production. Fifteen isolates metabolized only two carbohydrates; glucose and sucrose. Sucrose was an excellent substrate for abundant EPS synthesis. One isolate was able to metabolize four sugars; lactose, maltose, glucose and sucrose. Based on their phenotypic features, the 16 EPS-producing isolates were identified as *Leuconostoc mesenteroides* (15 strains) and *Lactobacillus fermentum* (one strain). The quantification of EPS was determined on different complex solid media. The amount of EPS produced was affected by the carbohydrate source. The EPS production increased with increasing sucrose concentration. Whey permeate agar medium containing 4 % sucrose supported the highest production of 6.9-16 g l^{-1}, depending upon *Leuconostoc* strain examined, suggesting that whey permeate can be used as cheap medium ingredients for EPS production. Natural lactose present in whey permeate might not be the limiting factor stimulating EPS production and emphasizes the importance of other permeate components for inducing EPS formation. While the optimum pH (6.5) was for EPS production and the greatest EPS production was obtained at incubation temperature 25 ºC. Of the all nitrogen sources tested, casein hydrolysate (0.4 %) had the highest significant influence on both bacterial biomass yield and EPS production. The extraordinary EPS production of 11000 - 25730 mg l^{-1} was obtained using *Leuc. mesenteroides* in the culture medium containing vitamins, amino acids and salts. Analysis of monosaccharide composition of EPS produced by *Leuc. mesenteroides* strains 10, 12 and 16 revealed that the polymers produced were neutral homopolysaccharides containing only glucose and had high molecular

weights of 289.1 x 10^6, 263 x 10^6 and 221.8 x 10^6 Da, respectively. The concentration of glucose in the isolated dried EPS was estimated to 50, 58 and 32%, respectively. A positive relationship between EPS concentration and viscosity was observed. The effect of laboratory EPS-producing *Leuc. mesenteroides* strains No10, 12 and 16 or *Lb. rhamnosus* on the chemical, microbiological, rheological and sensory properties of yoghurt and fermented buttermilk were investigated. Out of all yoghurt treatments, the use of EPS at a concentration of 0.4% gave the highest viable count of *Str. thermophilus*. On the other hand, 0.4 and 0.5% EPS and *Lb. rhamnosus* showed the highest apparent viscosity. The use of *Leuc. mesenteroides* No 12 and *Lb. rhamnosus* improved the apparent viscosity and organoleptic properties of the fermented buttermilk.

الموجز

تم عزل 210 مزارع بكتيريه تنتمى الى بكتريا حامض اللاكتيك من 120 عينه من أنواع مختلفه من اللبن الخام ، اللبن المتخمر التقليدى المصرى ، الجبن والذبده. أختبرت هذه العزلات مظهريا بصغه أوليه على أساس لزوجة المستعمرات وذلك لانتاج السكريات العديده على بيئة الـ MRS الصلبه المعدله والمحتويه على جلوكوز ، سكروز ، فركتوز ، مالتوز أو لاكتوز. من الـ 210 عزله كان لـ 16 عزله (7،6 %) فقط القدره على انتاج السكريات العديده. خمسة عشر عزله أمكنها تمثيل اثنين من الكربوهيدرات هى الجلوكوز والسكروز. السكروز كان بمثابة مادة ممتازه لتخليق وفير من السكريات العديده. عزله واحده كانت لها القدره على تمثيل أربع سكريات هى اللاكتوز ،المالتوز ، الجلوكوز و السكروز. على أساس الخصائص المزرعيه صنفت ال 16 عزله الى *Leuconostoc mesenteroides* (15 عزله) ، *Lactobacillus fermentum* (عزله واحده). التقدير الكمى للسكيات العديده أجرى على بيئات صلبه مختلفه. تأثرت كمية السكريات العديده بمصدر الكربون. زادت كمية السكريات العديده بزيادة تركيز السكروز. شجعت بيئة الـ whey permeate الصلبه المحتويه على 4 % سكروز انتاج عالى من السكريات العديده قدر بـ 6،9 – 16 جرام/لتر وذلك على حسب سلالة الـ *Leuconostoc* المختبره مما يدل على أن بيئة الـ whey permeate يمكن أن تستخدم كمكون رخيص لانتاج السكريات العديده. اللاكتوز الطبيعى الموجود فى الشرش قد لا يكون هو العامل المحدد لتنشيط انتاج السكريات العديده ويؤكد على أهمية المكونات الأخرى للشرش لتشجيع انتاج السكريات العديده. بينما تطابقت درجة الـ pH المثلى (6،5) لانتاج السكر العديد مع مثيلتها للنمو الأمثل كانت درجة الحراره المثلى (25 م°) لانتاج السكر العديد أقل من مثيلتها (30 م°) للنمو الأمثل. من كل مصادر النيتروجين التى أختبرت كان للكازين (4،. %) أعلى تأثير معنوى على انتاج الخلايا البكتيريه والسكريات العديده. أمكن الحصول على انتاج وفير بدرجه غير عاديه قدر بـ 11000– 25730 ميلليجرام/لتر باستخدام سلالات الـ *Leuconostoc mesenteroides* فى بيئه مدعمه بالفيتامينات, الأحماض الأمينيه والأملاح. أظهر تحليل السكريات الأحاديه المكونه للسكريات العديده المنتجه من سلالات الـ *Leuconostoc mesenteroides* أرقام 10, 12 , 16 أن السكريات العديده المنتجه كانت متعادلة من نوع واحد من السكريات الأحاديه هو الجلوكوز وكان لها أوزان جزيئيه عاليه قدرت بـ10^6 x 289.1 , 10^6 x 221.8 10^6 x 263 دالتون على التوالى. بلغت نسبة الجلوكوز فى السكر العديد 50 , 58 , 32 % على التوالى. تقدير لزوجة السكريات العديده المتحصل عليها أعطى علاقه ايجابيه بين التركيز واللزوجه. كما تمت دراسة

تـاثير اضـافة السـكريات العديـدة المنتجـة معمليـا و كـدالك السـلالات علـى الخـواص الكميائيـة و الميكروبيولوجيـة و الحسـية للـبن الخـض و الزبـادى . مـن جميـع المعـاملات للزبـادى ادى اسـتخدام تركيز 4.% من السكر العديد الـى زيـادة اعداد *Str.thermophilus* كمـا ادى اسـتخدام تركيـزات 4. و 5. % سكر عديد وكزالك استخدام *Lb. rhamnosus* الـى زيـادة نسـبة اللزوجـة للزبـادى. أسـتخدام السـلالات*Leuc. mesenteroides* رقـم 10,12و 16و كزالـك *Lb. rhamnosus* حسنت من الخواص الحسية واللزوجة للبن الخض المتخمر

دراسات على انتاج السكريات العديدة من بكتريا حامض اللاكتيك

رسالة مقدمة من

سحر حسن صلاح محمد

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (الالبان)

كلية الزراعة – جامعة القاهرة 1990

ماجستير فى العلوم الزراعية (الالبان) جامعة القاهرة 2000

للحصول على درجة

دكتوراة (فلسفة) فى العلوم الزراعية

(ميكروبيولوجيا زراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية

كلية الزراعة

جامعة القاهرة

2006

دراسات على انتاج السكريات العديدة من بكتريا حامض اللاكتيك

رسالة مقدمة من

سحر حسن صلاح محمد

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (الالبان) كلية الزراعة – جامعة القاهرة 1990
ماجستير فى العلوم الزراعية (الالبان) جامعة القاهرة 2000

للحصول على درجة

دكتوراة (فلسفة) فى العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية)
كلية الزراعة – جامعة القاهرة
2006

لجنة الناقشة :

ا.د./ نرجس حسن محمد السيد _____
أستاد ميكروبيولوجيا الألبان – قسم الألبان – المركز القومى للبحوث

ا.د. / محمد فايز فؤاد _____
أستاد و رئيس قسم الميكروبيولوجيا الزراعة– كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. / رفاعى ابراهيم رفاعى _____
أستاد الميكروبيولوجيا الزراعية المساعد – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

ا.د./ حسين عزاز مراد _____
أستاد ميكروبيولوجيا الألبان – قسم الألبان – المركز القومى للبحوث

/ / 2006

دراسات على انتاج السكريات العديدة من بكتريا حامض اللاكتيك

رسالة مقدمة من

سحر حسن صلاح محمد

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (الالبان)

كلية الزراعة – جامعة القاهرة 1990

ماجستير فى العلوم الزراعية (الالبان) جامعة القاهرة 2000

للحصول على درجة

دكتوراة (فلسفة) فى العلوم الزراعية

(ميكروبيولوجيا زراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية

كلية الزراعة

جامعة القاهرة

2006

تحت اشراف

د. / رفاعى ابراهيم رفاعى

أستاد الميكروبيولوجيا الزراعية المساعد – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

ا.د./ حسين عزاز مراد

أستاد ميكروبيولوجيا الألبلن – قسم الألبلن – المركز القومى للبحوث

ACKNOWLEGMENT

First of all, ultimate thanks are due to Allah, who without his aid this work could note be done.

The authoress would like to express her gratitude to Prof. Dr. Gamil A. Amin and Prof. Dr. Refae Ibrahim Refae, Faculty of Agriculture, Cairo University, for their incessant supervision, valuable help, plentiful advice, and endless effort provided to achieve this work.

I want to express my deep gratitude to Prof. Dr. Hussen Azzaz Murad, Dept. Dairy Science. National Research Center (NRC) for his guidance, valuable suggestions, encouragement and every possible help kindly offered throughout the course of this work.

Thanks are also due to Dr. Mosa Maaly Aeid, Dept. Dairy Sciences, NRC for his help, valuable suggestions throughout this work.

Many thanks are also due to all staff members of Microbiology Department Faculty of Agriculture, Cairo University and of Dairy Research Laboratory , NRC, Cairo, for their great help.

Dedication

I dedicate this work to my father and my mother and with great pleasure to my sisters and my brother.

And with all of my love to my husband
To dear my lovely daughter Sarah
To dear my sons Ahmed and Abdo-lah

Whose love and patient support make my busy life possible.

CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION……	1
2. REVIEW OF LITERATURE ……	4
2.1. Lactic acid bacteria (LAB)……	4
2.2. Isolation of LAB …….	4
2.3. Exopolysaccharides (EPS) from LAB ……	5
2.4. The composition and structure of EPS from LAB……	8
2.4.1. The composition ……	8
2.4.2. The structure ……...	13
2.5. Factors that influence EPS production from LAB……	13
2.5.1. Effect of temperature …….....	13
2.5.2. Effect of pH……	16
2.5.3. Effect of nitrogen sources……..	19
2.5.4. Effect of amino acid, salts and vitamins……	21
2.5.5. Effect of inoculum size……..	21
2.5.6. Effect of incubation period……..	22
2.5.7. Effect of carbon source……..	23
2.6. Utilization of whey for EPS production……	25
2.7. Application of EPS from LAB……..	26
3. MATERIALS AND METHODS ……	30
3.1. Milk ……..	30
3.2. Buttermilk ……	30
3.3. Ultra filtrate milk permeate……..	30
3.4. Yoghurt starter culture …….	30
3.5. Buttermilk starter culture …….	30
3.6. Bacterial reference strains…….	30
3.7. Sampling……	31
3.8. Isolation of LAB……...	31
3.9. Screening of LAB for EPS synthesis ……...	32

3.10. Phenotypic and biochemical characterization of selected isolates……..... 32
3.11. Effect of growth media on EPS production…… 33
3.12. Effect of sugar concentration on EPS production……. 33
3.13. Other factors affecting bacterial biomass yield and EPS production …… 33
3.13.1. Effect of pH …… 36
3.13.2. Effect of temperature…… 36
3.13.3. Effect of fermentation time…… 36
3.13.4. Effect of inoculum size……. 36
3.13.5. Effect of type and concentration of nitrogen…… 36
3.13.6. Effect of vitamins…… 36
3.13.7. Effect of amino acids…… 37
3.13.8. Effect of salts …… 37
3.14. Isolation and purification of EPS……..... 37
3.14.1. Determination of EPS molecular weight…… 38
3.14.2. Estimation of EPS composition…… 38
3.14.3. Viscosity of EPS…… 38
3.15. Bacterial growth determination…… 39
3.16. pH determination…… 39
3.17. Total solids content……. 39
3.18. Total sugars……. 39
3.19. Total nitrogen…….. 40
3.20. Determination of diacetyl and acetaldehyde…… 40
3.21. Lyophilization of EPS…… 40
3.22. Yoghurt manufacturing using purified EPS as stabilizer… 40
3.23. Fermented buttermilk manufacturing using isolated strains…… 41
3.24. Sensory evaluation …… 42
3.25. Microbiological analysis of fermented buttermilk and yoghurt…… 42

3.26. Viscosity measurement…… 43

3.27. Statistical analysis …… 43
3.28. Culture media …… 43
4. RESULTS AND DISCUSSION …… 46
4.1. Screening of LAB for EPS synthesis…… 46
4.2. Identification of EPS producing LAB…… 48
4.3. Effect of growth media on EPS production…… 52
4.4. Effect of sugar concentration on EPS production…… 57
4.5. Other factors affecting biomass and EPS production…… 63
4.5.1 Effect of pH…… 63
4.5.2. Effect of incubation temperature…… 66
4.5.3. Effect of incubation time…… 70
4.5.4. Influence of supplementation with different N-sources 74
4.5.4.1. Effect of organic nitrogen…… 74
4.5.4.2. Effect of inorganic nitrogen …… 80
4.5.5. Effect of inoculum concentration……... 87
4.5.6. Effect of vitamins……... 87
4.5.7. Effect of amino acids…….. 94
4.5.8. Effect of minerals……... 97
4.6. Monosaccharide composition and molecular mass of EPS 98
4.7. Viscosity of EPS…… 101
4.8. Application of laboratory - produced EPS, in the manufacture of set yoghurt and fermented buttermilk..... 105
4.8.1. Set yoghurt..... 105
4.8.1.1. Chemical properties……..... 105
4.8.1.2. Microbiological properties……..... 108
4.8.1.3. Rheological properties ……... 110
4.8.1.3.1. Synersis…… 110
4.8.1.3.2. Viscosity……..... 112
4.8.1.3.2.1. Apparent viscosity…… 112