

# المحفزات الحيوية البكتيرية في الأغذية المتخمرة

رسالة مقدمة من

رنيم مجدي محمود محمد الأشقر  
بكالوريوس في العلوم الزراعية ( صناعات غذائية )، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، 2010

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية  
(الميكروبيولوجيا الزراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية  
كلية الزراعة  
جامعة القاهرة  
مصر

2016

# المحفزات الحيوية البكتيرية في الأغذية المتخمرة

رسالة ماجستير  
في العلوم الزراعية  
(الميكروبيولوجيا الزراعية)

مقدمة من

رنيم مجدي محمود محمد الأشقر

بكالوريوس في العلوم الزراعية (صناعات غذائية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، 2010

لجنة الحكم

دكتور / الشحات محمد رمضان

.....  
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة عين شمس

دكتور / ألفت سيد محمود بركات

.....  
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور / منى حسين بدوي

.....  
أستاذ مساعد الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ محمد زكريا

صديق

.....  
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

التاريخ 2016/ 7 / 27

# المحفزات الحيوية البكتيرية في الأغذية المتخمرة

رسالة ماجستير  
في العلوم الزراعية  
(الميكروبيولوجيا الزراعية)

مقدمة من

رنيم مجدي محمود محمد الأشقر

بكالوريوس في العلوم الزراعية ( صناعات غذائية )، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، 2010

لجنة الإشراف

دكتور/ محمد زكريا صديق  
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور / منى حسين بدوي  
أستاذ مساعد الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

الدرجة : الماجستير

اسم الطالب: رنيم مجدي محمود محمد الأشقر  
عنوان الرسالة : المحفزات الحيوية البكتيرية في الأغذية المخمرة  
المشرفون : دكتور : محمد زكريا صديق  
دكتور : منى حسين بدوي  
قسم : الميكروبيولوجيا الزراعية

تاريخ منح الدرجة : 2016/7/27

### المستخلص العربي

تعتبر المنتجات اللبنية من الأغذية الهامة للصحة العامة حيث تستخدم كأحد المصادر الهامة للفيتامينات والأملاح الهامة لصحة الجسم إلا أنها سريعة التلف ، وعلى الرغم من ذلك فإن البعض منها يستخدم كأغذية مخمرة . لهذا تتركز هذه الدراسة على بعض الاعتبارات الهامة لبكتيريا حامض اللكتيك من ناحية تأثيرها المباشر على إطالة فترة الحفظ لبعض الأغذية المخمرة . وتعتبر هذه الدراسة كأولى الخطوات الهامة على تطوير العائد المرجو من استخدام مثل هذه السلالات في حفظ الأغذية .

تم تجميع عدد 25 عينة من منتجات الألبان (زبادي-لين-جين) من الأسواق المحلية لمحافظة الجيزة وذلك لعزل والتعرف على العزلات البكتيرية التي لها نشاط صحي . حيث تم الحصول على عدد 132 عزلة بكتيرية ثم تنقيتها . كانت أعلى عدد من العزلات التي تم الحصول عليها من الأنواع العصوية الطويلة الموجبة لصبغة الجرام ، حيث وصلت أعدادها إلى 56 عزلة تليها في ذلك الأنواع الكروية ( 28 عزلة ) بينما مثلت الأنواع البكتيرية الأخرى عدد من العزلات يتراوح ما بين 13 ، 19 عزلة . أظهرت الغالبية العظمى من العزلات حجم مستعمرة أقل من 1 سم بينما أظهر القوام للمجموعة اختلاف ما بين المائي ، اليابس . أما بخصوص ألوان المجاميع فقد تراوحت ما بين الكريمي ، الأبيض ، الأصفر .

وقد مثلت العزلات التي تم الحصول عليها طبقا للصفات المورفولوجية خمسة أشكال مختلفة للكائنات الحية الدقيقة هي عصويات طويلة موجبة لصبغة الجرام ، خمائر وفطريات . أعطت الخلايا العصوية الطويلة الغير متجرّثة الموجبة الجرام أعلى نسبة ما بين اجمالي العزلات المتحصل عليها بلغت 42,2% تليها في ذلك الأنواع الكروية ( 27,2% ) ، البكتيريا المتجرّثة ( 14,4% ) ، الخمائو ( 12,1% ) ثم العصويات القصيرة السالبة الجرام ( 9,8% ) . طبقا للاختبارات الكيميائية التي تمت على العزلات المتحصل عليها للعصويات الطويلة الغير متجرّثة الموجبة الجرام أنها تتبع جنس *Lactobacillus* . تم انتخاب عدد 4 عزلات فقط ما بين ال 56 عزلة من جنس *Lactobacillus* طبقا للصفات المورفولوجية والاختبارات البيوكيميائية .

أظهر البكتيريوسين المنتج من العزلات الأربعة نشاط مضاد للميكروبات ضد كل من: *E. coli* , *S. aureus* , *B. cereus* . أعطى البكتيريوسين المنتج من العزلات نسبة تثبيط تصل إلى 100% مع ميكروب ال *E. coli* ، *S. aureus* ونسبة تثبيط أقل من 98% مع ميكروب *B. cereus* .

تم أيضا اختبار قدرة هذه العزلات كمضادات للبكتيريا لعدد عشرة من المجاميع البكتيرية خاصة 3 منهم هم *E. coli* , *B. cereus* , *L. monocytogenes* ، لأنهم من الميكروبات الممرضة التي تنتقل عن طريق الاغذية وتصيب الجهاز المعوي، وقد أظهرت النتائج مقدرة عزلتين فقط على تثبيط 6 او 8 عزلات من البكتيريا المخمرة

أظهر اختبار تقدير الاعداد الكلية للميكروبات في السلامي ان الاعداد في البداية قد وصلت الى  $10 \times 2,1$  خلية لكل جرام وبعد التخزين في درجة حرارة التلاجة انخفضت الاعداد وعند زيادة فترة التخزين الى 30 ، 60 يوم ادى الى انخفاض الاعداد الى 52-72 خلية / جرام اعتمادا على العزلة المختبرة . اما بالنسبة لصوص الصويا فقد وصلت الاعداد الى  $10^6$  خلية / جرام في بداية التجربة الا انه بزيادة فترة التخزين فقد انخفضت الاعداد بحيث وصلت الى صفر في نهاية فترة التخزين ( شهرين ) .

أظهرت نتائج التحليل الجيني للسلالات المعزولة المختارة ( 4 عزلات ) ان هذه العزلات تنتمي لجنس *Lactobacillus* ومن تحليل ال phytogetetic والنيوكلو تيدات في اختبار 16srRNA تشابه العزلات وتم تصنيفهم *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus acidophilus*

الكلمات الدالة: PCR المتعدد ( PCR Multiplex ) ، 23S RNA ، 16SrRNA ، البريوتيكتيك ، السلامي ،

## الملخص العربي

### المحفزات الحيوية البكتيرية في الأغذية المتخمرة

تعتبر المنتجات اللبنية من الأغذية الهامة للصحة العامة حيث تستخدم كأحد المصادر الهامة للفيتامينات والأملاح الهامة لصحة الجسم إلا أنها سريعة التلف ، وعلى الرغم من ذلك فإن البعض منها يستخدم كأغذية متخمرة .

لهذا تتركز هذه الدراسة على بعض الاعتبارات الهامة لبكتيريا حامض اللكتيك من ناحية تأثيرها المباشر على إطالة فترة الحفظ لبعض الأغذية المتخمرة .

وتعتبر هذه الدراسة كأولى الخطوات الهامة على تطوير العائد المرجو من استخدام مثل هذه السلالات في حفظ الأغذية .

ويمكن تلخيص أهم النتائج التي تم الحصول عليها على النحو التالي:

- 1- تم تجميع عدد 25 عينة من منتجات الألبان (زبادي- لبن- جبن) من الأسواق المحلية لمحافظة الجيزة وذلك لعزل والتعرف على العزلات البكتيرية التي لها نشاط صحي .
- 2- تم الحصول على عدد 132 عزلة بكتيرية ثم تنقيتها .
- 3- كانت أعلى عدد من العزلات التي تم الحصول عليها من الانواع العصوية الطويلة الموجبة لصبغة الجرام ، حيث وصلت أعدادها إلى 56 عزلة تليها في ذلك الأنواع الكروية ( 28 عزلة ) بينما مثلت الأنواع البكتيرية الأخرى عدد من العزلات يتراوح ما بين 13 ، 19 عزلة .
- 4- اظهرت الغالبية العظمى من العزلات حجم مستعمرة أقل من 1 سم بينما اظهر القوام للمجموعة اختلاف ما بين المائي ، اليابس . أما بخصوص ألوان المجاميع فقد تراوحت ما بين الكريمي ، الأبيض ، الأصفر .
- 5- وقد مثلت العزلات التي تم الحصول عليها طبقا للصفات المورفولوجية خمسة أشكال مختلفة للكائنات الحية الدقيقة هي عصويات طويلة موجبة لصبغة الجرام ، خمائر وفطريات .
- 6- أعطت الخمائر العصوية الطويلة الغير متجرثمة الموجبة الجرام أعلى نسبة ما بين اجمالي العزلات المتحصل عليها بلغت 42,2% تليها في ذلك

الأنواع الكروية ( 27,2% ) ، البكتيريا المتجترمة ( 14,4% ) ، الخمائز ( 12,1% ) ثم العصويات القصيرة السالبة الجرام ( 9,8% ) .

٧ - طبقا للاختبارات الكيميائية التي تمت على العزلات المتحصل عليها للعصويات الطويلة الغير متجترمة الموجبة الجرام أنها تتبع جنس *Lactobacillus*

٨ - تم انتخاب عدد 4 عزلات فقط ما بين ال 56 عزلة من جنس *Lactobacillus* طبقا للصفات المورفولوجية والاختبارات البيوكيميائية.

٩ - اظهرت اختبارات تأثير درجات الحرارة على نمو العزلات الأربعة ان المدى الحراري لهم يتراوح ما بين 25 ، 45° م أي وسطية الحرارة ، وان درجة الحرارة المثلى بلغت 35° م لعدد 3 عزلات منهم وواحدة فقط كانت المثلى لها 45° م.

١٠ - أيضا تم دراسة درجة الحموضة والمدى المناسب للنمو لمثل هذه العزلات الأربعة ، وقد وجد أن درجة ال pH المثلى لهم كانت 5,5 واي زيادة او نقصان في درجة ال pH تؤدي إلى نقص كمية النمو البكتيري .

١١ - كما تم دراسة قدرة هذه العزلات على تخمير السكريات ، حيث اعطت السلالات الارعة مقدرته على تخمير سكريات المانيتول ، الجلوكوز ، الجالاكتوز ، اللاكتوز ، السكروز . ولم تعطي أي نتيجة مع سكر الفراكروز . اما بالنسبة لكل من سكر المانوز والسكريات فقد اعطت السلالات الاربعة اما نتيجة موجبة او سالبة .

١٢ - اظهر البكتيريوسين المنتج من العزلات الاربعة نشاط مضاد للميكروبات ضد كل من:

*E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus* . اعطى البكتيريوسين المنتج من العزلات نسبة تثبيط تصل إلى 100% مع ميكروب ال *E.coli*, *S.aureus* ونسبة تثبيط اقل من 98% مع ميكروب *B.cereus*

١٣ - تم ايضا اختبار قدرة هذه العزلات كمضادات للبكتيريا لعدد عشرة من المجاميع البكتيرية خاصة 3 منهم هم *E.coli* , *L.monocytogenes* , *B.cereus* لأنهم من الميكروبات الممرضة التي تنتقل عن طريق الاغذية

وتصيب الجهاز المعوي، وقد اظهرت النتائج مقدره عزلتين فقط على تثبيط  
6 او 8 عزلات من البكتيريا المتخمرة من كل من بيئتي MDA , MDB

١٤ اظهر اختبار تقدير الاعداد الكلية للميكروبات في السلامي ان الاعداد في  
البداية قد وصلت الى  $10 \times 2,1^8$  خلية لكل جرام وبعد التخزين في درجة  
حرارة التلاجة انخفضت الاعداد وعند زيادة فترة التخزين الى 30، 60  
يوم ادى الى انخفاض الاعداد الى 52-72 خلية / جرام اعتمادا على العزلة  
المختبرة.

١٥ لما بالنسبة لصوص الصويا فقد وصلت الاعداد الى  $10^6$  خلية / جرام في  
بداية التجربة الا انه بزيادة فترة التخزين فقد انخفضت الاعداد بحيث  
وصلت الى صفر في نهاية فترة التخزين ( شهرين ).

١٦ اظهرت نتائج التحليل الجيني للسلاطات المعزولة المختارة ( 4 عزلات )  
ان هذه العزلات تنتمي لجنس *Lactobacillus* ومن تحليل ال  
phytogetic والنيوكلو تيدات في اختبار 16srRNA تشابه العزلات  
وتم تصنيفهم *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus acidophilus*

# **PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTED FOODS**

**By**

**RANEEM MAGDY MAHMOUD MOHAMMED EL-ASHKAR**

**B. Sc. Agric. Sci., (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010**

**THESIS**

**Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirement for the Degree of**

**MASTER OF SCIENCE**

**In**

**Agricultural Sciences  
(Agricultural Microbiology)**

**Department of Agricultural Microbiology  
Faculty of Agriculture  
Cairo University  
EGYPT**

**2016**

APPROVAL SHEET

**PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTED FOODS**

**M.Sc. Thesis  
In  
Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)**

**By**

**RANEEM MAGDY MAHMOUD MOHAMMED EL-ASHKAR**  
**B.Sc. Agric. Sci., (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010**

APPROVAL COMMITTEE

**Dr. EL-SHAHAT MOHAMMED RAMADAN**.....  
**Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Ain Shams Univ.**

**Dr. OLFAT SAID MUHMOUD BARAKAT**.....  
**Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo Univ.**

**Dr. MONA HUSSEIN BADAWI**.....  
**Asst. Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo Univ.**

**Dr. MOHAMMED ZAKARIA SEDIK**.....  
**Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo Univ.**

Date: 27 / 7 / 2016

**SUPERVISION SHEET**

**PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTED FOODS**

**M.Sc. Thesis**

**In**

**Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)**

**By**

**RANEEM MAGDY MAHMOUD MOHAMMED EL-ASHKAR**

**B. Sc. Agric. Sci., (Food science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010**

**SUPERVISION COMMITTEE**

**Dr. MOHAMMED ZAKARIA SEDIK**

**Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo. University**

**Dr. MONA HUSSEIN BADAWI**

**Associate Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Name of Candidate:** Raneem Magdy Mahmoud Mohammed El-Ashker **Degree:** M.Sc.

**Title of Thesis:** Probiotic Bacteria In Fermented Foods

**Supervisors:** Dr. Mohammed Zakaria Sedik

Dr. Mona Hussein Badawi

**Department:** Agricultural Microbiology.

**Approval:** 27 / 7 /2016

### ABSTRACT

Dairy products are a healthy important and used as a source for vitamins and minerals for body healthy. But, it is also rapid to spoilage. Also, some food products are used as fermented foods. Therefore, the present study aims to focus on the general considerations of lactic acid bacteria and what is known of their direct effect on shelf life for some fermented foods. Twenty five of dairy products were collected from local markets of Giza Governorate, from which, 132 pure isolates were obtained. Selected isolates were transferred to MRS medium until morphological characters were examined. Long rods Gram positive gave the highest number of isolates reach the 56 isolates followed by cocci form (28 isolates). While, the other forms of isolates were ranged between 13 to 19 isolates. The bacteriocins obtained showed antimicrobial activity against *Escherichia. coli*, *S. aureus* and *B. cereus*. For *Escherichia. coli*, there was 100% of inhibition activity of the bacteriocins, while for *B. cereus* there was less bacteriocin activity (98%) using the bacteriocin from *Lactobacillus* spp. For *Staphylococcus* species, there was 100% inhibition activity. Also, the isolates were checked for their antimicrobial activity against *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *E. coli* which are common food borne pathogens that infect the gastro-intestinal tract and other seven bacterial species. The results showed that two of the isolates gave positive results against 8 and 6 of tested bacteria on Lac1 and Lca2. Total microbial count in salami at zero time reached to  $2.1 \times 10^8$  cfu/g , while, after 15 days of storage period at 0 °C decreased to  $10^5$ . By increasing the storage period to 30 and 60 days, the counts decreased and reached to 52 to 72 cfu/g depending on the isolate type tested. Microbial count in soy sauce reached to  $10^6$  cfu/g at zero time but by increasing the storage period, the counts decreased until approximately zero after 2 months after treatment with 4 lactobacilli isolates and preserved in a fridge. The genetic analysis of superior isolates as the sequences were subjected to similarity searches with public databases to infer a possible phylogenetic classification of 4 strains. The results revealed that the 4 strains were a member of the genus *Lactobacillus*. These became clear from the phylogenetic analysis and nucleotide by 16SrRNA sequence similarity values. As evidenced by 16SrRNA sequence analysis, the four strains were recognized as *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*.

**Keywords:** Multiplex polymerase chain reaction, Probiotic, *Lactobacillus*, 16S ribosomal RNA , 23S ribosomal RNA, Salami and Soy sauce.

## DEDICATION

*I dedicate this work to my dear and beloved mother, my dear sister "Umnia" and my dear brothers "Wissam and Akram" for all the support they lovely offered during my post-graduate studies and all my life. I will never let them down.*

## *ACKNOWLEDGEMENT*

*I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to Dr. Mohammed Zakaria Sedik Professor of Agricultural Microbiology and Dr. Mona Hussein Badawy Associate Professor of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for suggesting the problem, supervision, continued assistance, guidance through the course of my study as well as their revision of the manuscript of this thesis. Grateful appreciation is also extended to all staff members of the Agricultural Microbiology Department, Faculty of Agriculture, Cairo University.*

# CONTENTS

	<b>Page</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>REVIEW OF LITERATURE</b> .....	5
<b>1. General Description for lactic acid bacteria</b> .....	6
<b>2. Classification of Lactic Acid Bacteria</b> .....	7
<b>a. <i>Lactobacillus</i></b> .....	8
<b>(1) Historical background of <i>Lactobacillus</i></b> .....	8
<b>(2) Identification, classification and typing of <i>Lactobacillus</i> strains</b> .....	15
<b>b. <i>Bifidobacterium</i></b> .....	17
<b>c. <i>Leuconostoc</i></b> .....	17
<b>d. <i>Streptococcus</i></b> .....	18
<b>e. <i>Pediococcus</i></b> .....	18
<b>3. Role of Probiotics in Health and Diseases</b> .....	19
<b>a. Some of the beneficial effects of probiotic consumption</b> .....	19
<b>b. Roles of probiotics bacteria in dairy fermentation</b> .....	20
<b>4. Role of probiotics in foods and beverages</b> .....	23
<b>a. Dairy products</b> .....	23
<b>b. Non-dairy products</b> .....	28
<b>c. Fermented foods</b> .....	30
<b>5. Application of lactic acid bacteria (LAB) in some fermented foods and drinks</b> .....	31
<b>a. Fermented foods</b> .....	35
<b>(1) Fermented sausage</b> .....	38
<b>(2) Soy sauce</b> .....	40
<b>6. Interactions between probiotics and components of fermented foods</b> .....	42
<b>7. Antimicrobial properties of probiotic bacteria</b> .....	45
<b>8. Some notes on bacterial taxonomy</b> .....	46
<b>9. Molecular analysis</b> .....	48
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	51

<b>1. Sample collection</b> .....	51
<b>2. Isolation of lactic acid bacteria (LAB)</b> .....	52
<b>3. Morphological and Physiological Characteristics</b> .....	52
<b>a. Gram Staining</b> .....	52
<b>b. Catalase Test</b> .....	52
<b>c. Growth at different temperature</b> .....	52
<b>d. Sugar fermentation test</b> .....	52
<b>e. Oxygen requirement</b> .....	53
<b>f. Sodium chloride tolerance test</b> .....	53
<b>g. Bile tolerance isolates</b> .....	53
<b>h. Tolerance to acidic pH values</b> .....	54
<b>i. Evaluation of antagonistic activity</b> .....	54
<b>j. Determination of antimicrobial activity</b> .....	55
<b>k. Bacteriocin detection</b> .....	56
<b>4. Molecular analysis</b> .....	57
<b>a. Bacterial DNA</b> .....	57
(1) Extraction of DNA.....	57
(2) PCR.....	58
<b>5. 16S rRNA Sequencing of One Representative Cocci Isolate</b> .....	58
<b>6. Microbial determination of fermented foods</b> .....	60
<b>a. Total microbial count of salami and soy sauce samples</b> .....	60
<b>7. Media used</b> .....	60
<b>8. Statistical analysis</b> .....	62
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	63
<b>1. RESULTS</b> .....	63
<b>a. Bacterial isolates</b> .....	63
<b>b. Morphological and biochemical properties of pure isolates</b> .....	63
<b>c. Biochemical tests and major properties</b> .....	65
<b>d. Bacteriocin assay</b> .....	71
<b>e. Antimicrobial activity</b> .....	71
<b>f. Total microbial count for salami sample</b> .....	74
<b>g. Total microbial count for soy sauce sample</b> .....	75
<b>h. Genetic Analysis of Superior Isolates</b> .....	76