CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY COLLECTED FROM DIFFERENT SOURCES

Mohamed Mustafa Aweem

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY COLLECTED FROM DIFFERENT SOURCES

Mohamed Mustafa Aween
(Matric. No. 4120060)

Thesis submitted in fulfillment for the degree of
Doctor of Philosophy in Science and Technology

Faculty of Science and Technology
UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA
NILAI

January 2016

DECLARATION OF THESIS AND COPYRIGHT

إقرار البحث العلمي وحق النشر

Student's Full Name / اسم الطالب بالكامل	**Mohamed Mustafa Aween**		
Academic Session / الفصل الدراسي	2015/2016	Matric No. / رقم التسجيل الجامعي	4120060
Research Title / عنوان البحث	CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY COLLECTED FROM DIFFERENT SOURCES		

I hereby declare that the work in this thesis/ project paper is my own except for quotations and summaries which have been duly acknowledged /

أني اقر واعترف بأن هذا البحث من عملي وجهدي الشخصي, أما المقتطفات والاقتباسات, فقد أشرت إلى مصادرها في هامش البحث.

I acknowledged that Universiti Sains Islam Malaysia reserves the right as follows /

أقر بأن تحتفظ جامعة العلوم الإسلامية الماليزية بالحقوق التالية:

1. The thesis/ postgraduate project paper is the property of Universiti Sains Islam Malaysia /

إن ملكية هذا البحث لجتمعة العلوم الإسلامية الماليزية

2. The library of Universiti Sains Islam Malaysia has the right to publish my thesis/ postgraduate project paper as online open access (fulltext) and make copies for the purpose of research or teaching and learning only /

تحتفظ جامعة العلوم الإسلامية الماليزية بحق النشر لهذا البحث العلمي أو المشروع العلمي على الإنترنت (البحث الكامل) وحق الطباعة بهذف إجراء البحث العلمي أو التعليم والتعلم فقط

.....	.....
(Student's Signature)	(Supervisor's Signature)
546076	Assoc. Prof. DR. Zaiton Hassan
(IC No./Passport No.)	(Name)
.....	.....
(Date)	(Date)

APPROVAL

This thesis in titled "**CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY COLLECTED FROM DIFFERENT SOURCES**" submitted to the Faculty of Science and Technology, USIM and accepted as fulfillment of the requirements to the A Doctor of Philosophy in Science and Technology (Microbiology).

ZAITON HASSAN, Ph.D,
Faculty of Science and Technology,
Universiti Sains Islam Malaysia

Date: January, 2016

AUTHOR DECLARATION

السلام عليكم ورحمة الله وبركاته

بسم الله الرحمن الرحيم

I hereby declare that the work in this thesis is my own except for quotations and summaries which have been duly acknowledged.

Date: January, 2016 Signature :

Name : Mohamed Mustafa Aween

Matric No. : 4120060

Address : B-173A, The Elements@ Ampang, Jalan Benban Off Jalan Ampang, 52200 Kuala Lumpur, Malaysia.

BIODATA OF AUTHOR

Mohamed Mustafa Aween (4120060) was born on the 22nd December 1986 in Misurata, Libya. He completed his primary and secondary education in Misurata, a city located in the north west of Libya. He is holder of the degree in Pharmaceutical Technology, after a 3-years program at the Faculty of Medical Sciences and Technology, Misurata, from 2005 to 2008. He is also holder of Master of Science in Microbiology, after 5 semesters at Faculty of Science and Technology, University Sains Islam Malaysia. He is at present A Doctor of Philosophy in Science and Technology student majoring in microbiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

In the name of Allah, the most Gracious, the most Merciful.

Allhamdulillah, all praises to Allah SWT for giving me the strength to complete this study.

A special gratitude and sincere appreciation goes to Associate Professor Dr. Zaiton Hassan, my supervisor for this thesis for her guidance, generous advises, helpful comments, patience and great concern from the beginning till the end of study, I consider myself very lucky to be given this honor to work with her.

I express my sincere gratitude to Dr. Nur Huda Faujan for her commendable advices and guidance in her capacity of co-supervisor. Your advices have been instrumental in the implementation of my study program.

My special acknowledgements and appreciation go to the person who I carry his name, my Grandfather (Mohamed Mustafa Aween) Rahmatu Allah Alaih, who supported me by his great advises prays, and following up my study updates. He was always waiting my graduation moment, but he passed away before it.

Not forgetting a branch of love and thankfulness to my wife, parents, uncle (My second father), uncle's wife (My second mother), brothers, sisters, cousins and my closed cousin Yousef Aween for their understanding, strong supports and advices.

I also would like to thank my great friends Dr. Mohamed Moftah Imdakim and Dr. Belal Jamal for their help and advises. As well as all my lab mates Ibrahim, Faiz, Akram, Shahidah, Hafiz, Ili and Razlan for their outstanding help and support.

Thank you.

ABSTRAK

Terdapat beberapa sebatian yang terlibat dalam aktiviti antimikrob pada madu. Kajian ini adalah untuk menentukan sama ada peptida menyumbang kepada aktiviti antimikrob terhadap beberapa patogen tahan rintangan kepada pebagai antibiotik. Sampel madu yang diperolehi dari pelbagai sumber (Malaysia, Libya dan New Zealand) telah dinilai bagi ciri-ciri antimikrob terhadap *Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli, Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan lima kaedah. Aktiviti antimikrob madu telah dikesan pada kepekatan yang lebih rendah (12%) dan kaedah plat microtiter adalah kaedah terbaik. Pengubahsuaian pH kepada pH 3. 5 dan 7 menghasilkan sedikit perubahan pada aktiviti antimikrob bergantung kepada sumber madu. Aktiviti antimikrob madu tidak dipengaruhi oleh pemanasan pada suhu 80°C dan 100°C selama 10 minit, tetapi sedikit peningkatan aktiviti antimikrob dikesan setelah pemanasan pada 121 ^{o}C selama 10 minit. Perawatan sampel madu dengan enzim pepsin dan chymotrypsin menurunkan aktiviti antibakteria semua sample madu kecuali madu Tualang (H026) dan madu Acacia (H031) yang menunjukkan peningkatan antimikrob yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap semua patogen, menunjukkan protein terlibat dalam aktiviti antimikrob. Kandungan protein pada madu adalah berbeza (0.315 kepada1.426 mg/ml): H026 (madu Tualang , 1,426 mg / ml), H020 (madu Hannon, 1.289 mg / ml), H032 (madu Acacia , 1.203 mg / ml), H031 (madu Acacia, 0.567 mg / ml), H035 (madu Manuka, 0.570 mg / ml), dan H030 (madu Acacia, 0.315 mg / ml). Jumlah kandungan asid amino di dalam madu adalah dalam lingkungan 1.290 ± 0.027 hingga 2.670 ± 0.580 g/100 g dan jumlah asid amino ini berbeza dianatara semua sampel madu. Madu Acacia mengandungi lapan daripada asid amino perlu terutamanya threonine (0.044 ± 0.013 g/100g) dan tertinggi dalam asid amino tidak perlu (asid aspartik dan tyrosina). Kandungan serina, glysina, methionina dan lysina dikesan paling tinggi pada madu Alseder. Kandungan peptida yang diperolehi melalui kaedah OPA adalah paling tinggi pada sampel H026 (madu Tualang, 1.542 mg / ml) diikuti oleh H032 (madu Acacia, 1.140 mg / ml) dan jumlah yang paling rendah adalah dari sampel H035 (madu Manuka, 0.076 mg / ml). Peptida tidak dapat dikesan pada sampel H020 (madu Hannon) dan H027 (madu Manuka). Sebahagian kecil terkumpul 7 hinga13 yang diperolehi dari Sephadex 50G kromatografi turus halus menunjukkan protein dengan berat molekul yang berbeza-beza (6-250 kDa) dapat dikesan menggunakan SDS-PAGE. Pecahan protein sampel madu kemudiannya dipecahkan menggunakan RP-HPLC. Aktiviti antimikrob adalah berkaitan dengan kandungan peptide dimana sebahagian kecil terkumpul 7 daripada sampel H032 (madu Acacia) memberikan nilai peptida tertinggi (3.27 mM) dan aktiviti antimikrob yang tinggi (78, 53%), manakala sebahagian kecil terkumpul 3 dan 4 dari H026 (madu Tualang) menunjukkan kandungan peptida yang lebih rendah (3.11 dan 2.76 mM) tetapi aktiviti antimikrob yang lebih tinggi (96.02 dan 78.67%). Pecahan 7 ke 13 yang diperoleh daripada kromatografi Sephadex G-50 Fine menunjukkan protein dengan berat molekular yang berbeza (6 ke 250 kDa) dikesan menggunakan SDS-PAGE. Pecahan 9 daripada sampel H026 (madu Tualang) dan pecahan 11 daripada sample H032 (madu akasia) menunjukkan kandungan petida yang tinggi (0.937 dan 0.45 mg/ml) dan aktiviti antibakteria sederhana (41.02 dan 37.26%), masing-masing. Lima belas peptida *de novo* telah dikesan daripada H026 (madu Tualang) dan lima peptide *de*

novo daripada H032 (madu Acacia). Oleh itu, kajian ini menunjukkan bahawa madu mengandungi peptida antibakteria dari sumber yang telah dikenalpasti dan *de novo* yang menyumbang kepada aktiviti antimikrob madu.

ABSTRACT

A number of compounds have been implicated for the antimicrobial activity of honey. This study was carried out to determine if peptides contributed to antimicrobial activity against selected multiantibiotic resistant pathogens. Honey samples obtained from different sources (Malaysian, Libyan and New Zealand) were evaluated for the antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* using five methods. The antimicrobial activity of honey was detected at lower concentration (12%) and microtiter plate method was the best. Adjusting the pH of honey to 3, 5 and 7 resulted in slight changes in antibacterial activity either increase or decrease depending on source of honey. The antibacterial activity of honey samples was not affected by heating at 80 and 100^{o}C for 10 min, but a slight increase in activity was detected after heating at 121^{o}C for 10 min. Treating honey samples with the enzymes chymotrypsin and pepsin decreased antibacterial activity of honey samples except for Tualang honey (H026) and Acacia honey (H031) which showed significant ($p<0.05$) increase against all pathogens, indicating protein were involved in the antimicrobial activity. The protein content of honey samples varied from 0.315 to 1.426 mg/ml, H026 (Tualang honey, 1.426 mg/ml), H020 (Hannon honey, 1.289 mg/ml), H032 (Acacia honey, 1.203 mg/ml), H031 (Acacia honey, 0.567 mg/ml), H035 (Manuka honey, 0.570 mg/ml), and H030 (Acacia honey, 0.315 mg/ml). Total amino acids content of honey was in the range of 1.290±0.027 to 2.670±0.580 g/100g and consists of variable amounts of essential amino acids among the honey samples. Acacia honey contains eight of the essential amino acids especially threonine (0.044±0.013 g/100g) and, highest concentrations of the non-essential amino acids (aspartic acid and tyrosine). High concentration of serine, glycine, methionine and lysine were detected in Alseder honey compared to other honey samples. The peptide content as evaluated by OPA method showed that H026 (Tualang honey) was 1.542 mg/ml followed by H032 (Acacia honey, 1.140 mg/ml) and the lowest amount was shown by H035 (Manuka honey, 0.076 mg/ml). Peptide was not detected in H020 (Hannon honey) and H027 (Manuka honey). Protein fractions of honey samples were further separated by RP-HPLC. The antimicrobial activity seems to be related to the peptide content; fraction 7 from H032 (Acacia honey) showed the highest peptide content (3.27 mM) and high antibacterial activity (78.53%), while fractions 3 and 4 from H026 (Tualang honey) showed slightly lower peptide content (3.11 and 2.76 mM, respectively), but higher antibacterial activity (96.02 and 78.67%). Fractions 7 to 13 obtained from Sephadex G-50 Fine column chromatography showed proteins with different molecular weights (6 to 250 kDa) as detected using SDS-PAGE. Fractions 9 from sample H026 (Tualang honey) and fractions 11 from sample H032 (Acacia honey) showed high peptide content (0.937 and 0.450 mg/ml) and moderate antibacterial activity (41.02 and 37.26 %, respectively). Fourteen *de novo* peptides were detected from of Tualang honey nd five *de novo* peptides from Acacia honey. Therefore, this study showed that honey contains antibacterial peptides both from known sources and *de novo* that contribute to the antimicrobial activity of honey.

الملخص

عدد من المركبات هي المسؤولة على الفعالية المضادة للميكروبات من العسل. هذه الدراسة أجريت لتري ادا البيتيدات من العسل هي المسؤولة عن فعالية العسل المضادة للميكروبات التي لا تتأثر بالمضادات الحيوية. عينات العسل جابت من عدة مصادر (ماليزيا, ليبيا و نيوزيلاندا) وأختبرت فعاليتها المضادة للبكتيريا ضد ستافيلوكوكوس ايريوس, سالمونيلا تايفيميريوم, ايشيرشيا كولاي, باسيلس سبتيلس و سيدوموناس ايروجيناس باستخدام خمس طرق. الفعالية المضادة للبكتيريا اختبرت حتى بتركيز قليل (12%) وطريقة الميكروتيتر بليتس كانت الأفضل. تثبيت درجة حموضة العسل على 3, 5 و 7 نتج عنه تغييربسيط في الفعالية المضادة للبكتيريا بلأرتفاع أوالأنخفاض معتمد على مصدر العسل.فعالية العيل المضادة للبكتيريا لم تتأثر بالتسخين الى درجة حرارة 80 و 100 مئوية لمدة عشر دقائق, لكن زيادة في الفعالية لوحظت عند التسخين الى 121 درجة مئوية لمدة عشر دقائق. تحليل العسل بأنزيمات الكيموتربسين والببسين نتج عنه انخفاض في الفعالية المضادة للبكتيريا ماعدا عسل التوالانق الماليزي (H026) و الأكاشيا الماليزي (H031) والتي اوضحت زيادة ملحوظة ($p>0.05$) في الفعالية المضادة للبكتيريا ضد كل البكتيريا المختبرة, الدي يبين وجود البروتين في عينات العسل. محتوى البروتين في عينات العسل يتراوح من 0.315 الى 1.426 ملج/مل, H026 (عسل التوالانق, 1.203 ملج/مل), H020 (عسل الحنون, 1.289 ملج/مل), H032 (عسل الأكاشيا, 1.203 ملج/مل), H031 (عسل الأكاشيا, 0.567 ملج/مل), H035 (عسل المانوكا, 0.570 ملج/مل) و H030 (عسل الأكاشيا, 0.315 ملج/مل). اجمالي الأحماض الأمينية في العسل كانت تتراوح من 1.290±0.027 الى 2.670±0.580 جم\10/جم وأيضا يحتوي على الأحماض الأمينية الأساسية بأختلاف عينات العسل. عسل الأكاشيا يحتوي على ثمان أحماض أمينية أساسية وخاصة ثيرونين (0.044±0.013 جم/100جم) وأعلى تركيز للأحماض الأمينية الغير أساسية (حمض الأسبارتيكو الثيروسين). تراكيز عالية من السيرين, الجليسين, ميثيونين واللايسين اكتشفت في عسل السدر مقارنة بعينات العسل الأخرى. محتوى البيتيدات حلل باستخدام طريقة الأو بي أي (OPA) وبين أن H026 (عسل التوالانق) احتوى على 1.542 مج/مل ويتبعه H032 (عسل الأكاشيا, 1.140 مج/مل) والأقل تركيز من البيتيدات كان من H035 (عسل المنوكا, 0.076 مج/مل). البيتيدات لم تكتشف في H020 (عسل الحنون) و H027 (عسل المنوكا). عزلات البروتينات من العسل فصلت باستخدام جهاز الأر بي أتش بي أل سي (RP-HPLC). الفعالية المضادة للبكتيريا للعزلات من الممكن ان تكون مرتبطة بتركيز البيتيدات. العزلة 7 من H032 (عسل الأكاشيا) أظهرت أعلى تركيز للبيتيدات (3.27 مل/مولر) وفعالية مضادة للبكتيريا عالية (78.53%), وبينما العزلة 3 و4 من H026 (عسل التوالانق) أظهرت تركيز بيبتيدات بنسبة بسيطة أقل (3.11 و 2.76 مل/مولر, تتابعي) ولكن أعلى في الفعالية المضادة للبكتيريا (96.02 و78.67%). العزلة 9 من H026 (عسل التوالانق) و العزلة 11 من H032 (عسل الأكاشيا) أظهرت تركيز عالي من البيتيدات (0.937 و0.450 ملج/مل, تتابعي) وفعالية مضادة للبكتيريا متوسطة (41.02 و 37.26%, تتابعي). خمسة عشر ببتيدات غير معروفة صنفت من عزلات H026, بينما خمسة ببتيدات غير معرفة من عزلات H032. يستنتج أن, العسل يحتوي على ببتيدات غير معروفة ولها فعالية مضادة للبكتيريا وهي مسؤولة عن فعالية العسل المضادة للبكتيريا.

CONTENT PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF APPENDIX

LIST OF ABBREVIATION AND SYMBOLS

H020	Hannon honey
H025	Alseder honey
H026	Tualang honey
H027	Manuka honey (5+)
H028	Kharoob honey
H030	Acacia honey
H031	Acacia honey 2
H032	Acacia honey 3
H035	Manuka honey 2 (10+)
µL	microliter
$^{\circ}C$	Degree Celsius
a*	redness
BSA	Bovine serum albumin
$CaCO_3$	Calcium carbonate
CFU/g	Colony forming unit/gramme
cm	Centimetres
CO_2	Carbondioxide
ddH_2O	Distilled water
dH_2O	Deionised water
g	Grammes
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
AMPs	Antimicrobial peptides
h	Hours
H_2O	Water
H_2O_2	Hydrogen peroxide
HCL	Hydrochloric acid

Hz	Hertz
KDa	Kilodalton
Da	Dalton
Kg	Kilogramme
Kg/g	Kilogramme/gramme
Mg	Milligramme
mg/g	Milligramme/gramme
mg/kg	Milligramme/kilogramme
mg/ml	Milligramme/milliliter
ml	millilitres
mL/kg	millilitres/kilogramme
mM	millimollar
Mmol/g	millimole/gramme
rpm	revolution per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylenediamine
OPA	O-phthalaldehyde
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. Typhimurium	*Salmonella* Typhimurium .
E. coli	*Escherichia coli*
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
MAR	Multiple Antibiotic Resistance