CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF MILK CLOTTING ENZYME FROM LACTIC ACID BACTERIA AND IT'S APPLICATION

MOHAMED MUFTAH AHMAD IMDARIM

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF MILK CLOTTING ENZYME FROM LACTIC ACID BACTERIA AND IT'S APPLICATION

MOHAMED MUFTAH AHMAD IMDAKIM

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF MILK CLOTTING ENZYME FROM LACTIC ACID BACTERIA AND IT'S APPLICATION

Mohamed Muftah Ahmad Imdakim
(Matric No. 4090093)

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

(Food Biotechnology)

Faculty of Science and Technology
UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA
NILAI

January 2016

APPROVAL

The thesis entitled **"CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF MILK CLOTTING ENZYME FROM LACTIC ACID BACTERIA AND IT'S APPLICATION"** submitted by Mr. Mohamed Muftah Ahmad Imdakim (Matric. No. 4090093) for the Doctor of philosophy of Science and Technology was duly approved by the following academic authorities:

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

Date: January 2016

AUTHOR'S DECLARATION

بسم الله الرحمن الرحيم

I hereby declare that the work in this thesis entitled **"CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF MILK CLOTTING ENZYME FROM LACTIC ACID BACTERIA AND IT'S APPLICATION"** and submitted for the award of Doctor of philosophy in Science and Technology is my own except for quotations and summaries which have been duly acknowledged.

Date:
Signature:
Name: MOHAMED MUFTAH AHMAD IMDAKIM
Matric No: 4090093
Address: Faculty of Science and Technology
Universiti Sains Islam Malaysia (USIM)
71 800 Nilai, Negeri Sembilan, Malaysia

BIODATA OF AUTHOR

Mohamed Muftah Ahmad Imdakim (4090093) was born on the 1st January, 1967 in Awbari Libya (546076). He completed his primary, secondary and tertiary education in Sebha, Libya. His bachelor and masters degree was in Food Science (Dairy Science) from Sebha University in Libya. He is presently a Phd student in the Universiti Sains Islam Malaysia majoring in Food Biotechnology. His hobbies are travelling and reading.

ACKNOWLEDGEMENTS

بسم الله الرحمن الرحيم

All praises and adorations belong to Almighty Allah, The Creator of the universe. May the blessing of Allah be upon the Noble Prophet Mohammed (S.A.W) and those who follow him till the day of judgement.

I will like to express my deepest gratitude to my supervisor Assoc. Prof Dr. Zaiton Hassan for her help and guidance throughout my work. Thank you Assoc. Prof Dr. Zaiton Hassan for accepting me into your lab. Words cannot express my sincere gratitude to you for the countless hours you spent editing my thesis, generating all sorts of wonderful ideas and for making me feel confident about the data I present. I wouldn't have gotten this far if it weren't for your insight, patience and constant advice.

My deepest gratitude also goes to the laboratory assistants in the faculty Mr Freddy, Puan Normah Haron, Sarina and others I cannot mention for their patience in demonstrating the use of some of the equipment/instruments used in this research. Also my gratitude goes to the Dean and staff of the faculty of science and technology.

Furthermore, my prayer goes to the gentle soul of my father, who waited patiently for the completion of this work but Allah took him during the course of completing my thesis. May Allah repose his soul and grant him Janatul-Firdaus (Amin). My appreciation also goes to my mother, who has always been my pillar of support, may Almighty Allah prolong her life with good health.

My heartfelt gratitude also goes to all my colleagues and lab mates Aween, Akram, Razlan, Belal, Lawal Sa'adu, Ibrahim, Illi Farhana, Shahidah, Hafiz, Muhammad Faiz, Nani, Haitham for their friendship, support, criticism and contributions.

Finally, I will like to appreciate my wife and kids for their understanding, encouragement and moral support.

ABSTRAK

Bakteria asid laktik (LAB) mampu menghasilkan enzim ekstraselular yang boleh dieksplotasikan untuk kegunaan industri tenusu. Sepuluh daripada 135 LAB yang dipencilkan dari sumber makanan berbeza menghasilkan enzim ekstraselular dan enam LAB adalah dari makanan tertapai di Malaysia (belacan, pekasam, budu, yogurt susu kambing dan halia tertapai) telah menghasilkan enzim yang memepunyai aktiviti pembekuan susu (MCA). MCA daripada LAB tersebut adalah di antara 30 dan 50 SU/ml. Enam LAB telah dikenalpasti menggunakan kit 50CHL API dan disahkan dengan analisis 16S rDNA sebagai *Pediococcus acidilactici* SH *Lactobacillus paracasei* CF1, *Lactobacillus plantarum* ASC1, *Lactobacillus plantarum* H6M, *Enterococcus faecium* FFA, dan *Enterococcus faecium* FFB. MCA tertinggi iaitu 50.0 dan 43.0 SU/ ml telah dihasilkan oleh *P. acidilactici* SH dan *L. paracasei* CF1, masing-masing dan telah dipilih untuk analisis selanjutnya. Sumber nitrogen, pH dan suhu memberi kesan yang ketara ($p < 0.05$) ke atas enzim MCA yang dihasilkan oleh kedua-dua LAB. Di antara sumber nitrogen iaitu kasein, triptofan, triptikase pepton dan tripton soya yang ditambah kepada media pengeluaran enzim, didapati kasein telah meningkatkan MCA dengan ketara ($p < 0.05$) dengan nilai 75.0 SU/ ml untuk *P. acidilactici* SH pada 0.5% kasein dan 57.0 SU/ ml untuk *L. paracasei* CF1 pada kepekatan 0.1% kasein. pH dan suhu optimum untuk penghasilan MCA ialah pada pH 6 dan 50 ºC bagi *P. acidilactici* SH, dan pH 7 dan 40 ºC untuk *L. paracasei* CF1. SDS-PAGE bagi enzim yang ditulenkan menggunakan ammonium sulfat dan Sephadex G-50 halus menghasilkan beberapa jalur protin dengan berat molekul menghampiri 30 dan 27 kDa untuk *P. acidilactici* SH dan *L. paracasei* CF1, masing-masing. Analisis urea SDS-PAGE telah menunjukkan enzim yang dihasilkan oleh kedua dua LAB ini *L. paracasei* CF1 menghidrolisis κ-kasein dan hidroslisis tidak lengkap bagi α dan β-kasein, manakala enzim yang dihasilkan oleh *P. acidilactici* SH adalah aktif keatas κ-kasein tetapi tidak pada α dan β-kasein. Penambahan enzim sejukbeku pada kadar 1% g/ml kepada susu kambing dan susu skim (12% g/ml) telah berjaya menghasilkan tekstur dadih yang boleh diterima.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are known to produce extracellular enzymes that could be exploited for use in the dairy industry. Ten of 135 LAB isolated from different food sources produced extracellular enzyme of which six LAB isolates from Malaysian fermented foods (belacan, pekasam, budu, fermented buffalo milk and fermented ginger) produced milk clotting activity (MCA). The MCA of the isolates ranged between 30 and 50 SU/ml. The six isolates were identified by (API 50CHL) and confirmed by the sequence analysis of 16S rDNA gene as *Pediococcus acidilactici* SH, *Lactobacillus paracasei* CF1 *Lactobacillus plantarum* ASC1, *L. plantarum* H6M, *Enterococcus faecium* FFA, and *Enterococcus faecium* FFB. High MCA of 50.0 (SU/ ml) and 43.0 (SU/ ml) were shown by *P. acidilactici* SH and *L. paracasei* CF1, respectively and were chosen for further analysis. Nitrogen sources, pH and temperature significantly ($p<0.05$) influenced the MCA of enzymes produced by the two LAB. Among the nitrogen sources namely, casein, tryptophan, trypticase peptone and tryptone soya added to the enzyme production media, casein was found to increase significantly ($p<0.05$) the MCA to (75SU/ ml) for *P. acidilactici* SH and 57.0 (SU/ ml) for *L. paracasei* CF1, at casein concentration 0.5 % and 1%, respectively. The optimum pH and temperatures for maximum MCA were pH 6 and 50 °C for *P. acidilactici* SH and pH 7 and 40 °C for *L. paracasei* CF1. SDS-PAGE of the purified enzyme by ammonium sulfate and Sephadex G-50 fine produced bands with a molecular weight of approximately 30 KDa and 27 KDa for *P. acidilactici* SH and *L. paracasei* CF1, respectively. Urea SDS-PAGE analysis showed that MCE produce by *L. paracasei* CF1 hydrolysed κ-casein and incomplete degradation of α and β-casein, while MCE produce by *P. acidilactici* SH was active on κ-casein but not on α and β-casein. Addition of freeze dried enzyme (1% w/v) to goat milk and skim milk (12.5% w/v) successfully produced a dadih with the acceptable texture properties. This study indicates the possibility of exploiting LAB from food sources for the production of milk-clotting enzymes for dairy production

الملخص

كما هو معروف ان بكتيريا حمض الاكتيك تنتج الانزيمات الخارجية التي يمكن استخدامها في مصانع الالبان في هذة الدراسة قمنا بعزل 135 عزلة من بكتيريا حمض الاكتيك عزلت من اطعمة مختلفة وقد وجد ان ستة عزلات فقط من بكتيريا حمض الاكتيك عزلت من اطعمة ماليزيا مختلفة (بلتشان و بكسام و بودو ولبن الماعز و الزنجبيل المتخمر) لها القدرة على انتاج الانزيم المخثر للبن وكانت قوة التخثر مابين 30 وحدة سوكسليت الى 50 وحدة سوكسليت و قد عرفت هذه العزلات بطريقة اختبار تخمرالسكريات وكذلك اختبار الحض النووي للبكتيريا وكانت كلاتي بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي و لاكتوبسايس باراكاسي ولاكتوبسلس بلانتروم و ولاكتوبسلس بلانتروم و انتيروكوكس فاسيوم و انتيروكوكس فاسيو.

وقدأ ظهرت الانزيمات المستخلصة من العزلات بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي و لاكتوبسايس باراكاسي اعلى قوة تخثرللبن وكانت 50 وحدة سوكسليت و 43 وحدة سوكسليت على التوالي عليه تم اختيار هاتين العزلتين لمزيد من الاختبارات وبدراسة العوامل المؤثرة على نشاط الانزيم وجد ان قوة التخثر تأثر بمصدر النيتروجين المختلفة درجة الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة تأثير معنوي عند ($P< 0.05$) على بكتيريا حمض الاكتيك للانتاج الانزيم المخثر للبن وفي هذه الدراسة تما اضافت مصادر مختلفة من النيتروجين مثل الكازين و الصويا ببيتون و التربتوفان و التربتوكيس ببتون الى الوسط الغذائي للبكتيريا لانتاج الانزيم المخثر اللبن وقد وجد ان الكازين عند تركيز 0.5% له تأثير معنوي عند ($P<0.05$) في زيادة قوة التخثر وصلت الى 75 وحدة سوكسليت وذلك للانزيم المنتج بواسطة بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي و للانزيم المنتج بواسطة لاكتوبسايس باراكاسي كانت 54 وكانت درجة الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى للانزيم المنتج بواسطة بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي 6 و 50 درجة مئوية على التوالي بنما كانت للانزيم المنتج بواسطة لاكتوبسايس باراكاسي 7و 40 درجة مئوية على التوالي بينما خلصت نتائج الهجرة الكهربائية الى ظهور حزام له وزن جزيئي 29 و32 لكل من الانزيم المنتج بواسطة بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي و لاكتوبسايس باراكاسي على التوالي بينما اظهرت نتائج الهجرة الكهربائية مع الامونيا تأثير هذه الانزيمات على مكونات اللبن وكانت النتائج تأثير كامل على الكابا كازين وغير كامل على البيتا و الفا كازين للانزيم المنتج بواسطة و لاكتوبسايس باراكاسي بينما كانت للانزيم النتج بواسطة بيديو كوكس اسيدي لاكتيسي كانت النتيجة تكسير كامل للكابا كازين ولا تأثير يذكر على البيتا والفا كازين . في هذه الدراسة تم بنجاح انتاج جلي طري وذلك باضافة 1% من الانزيم المجفد الى اللبن المنزوع الدهن تركيزه 12.5% وكانت نتائج مقبولة من جانب الخواص الحسية وكذلك اظهرت هذه الدراسة الى امكانية انتاج الانزيم المخثر للبن من بكتيريا حمض الاكتيك واستخدامها في تصنيع منتجات الالبان.

CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF APPENDICES

LIST OF ABBREVITIONS AND SYMBOLS

Abos	absorbance
BSA	bovine serum albumin
°C	degree Celsius
µl	microliter
Ca^{2+}	calcium ion
$CaCO_3$	calcium carbonate
$CaCl_2$	calcium chloride
CCl_3COOH	trichloroacetic acid
$CH_3COONa.3H_2O$	sodium acetate trihydrate
Cm	centimeter
CN	casein
d	days
dH_2O	distilled water
ddH_2O	double-distilled water
DNA	deoxyribonucleic acid
$FeSO_4.7H_2O$	iron (II) sulfate anhydrate
g	gram
GL	gel filtration column using sephadex
GRAS	generally recognized as safe
h	hour
H_2O	water
H_2O_2	hydrogen peroxide
LAB	lactic acid bacteria
KDa	kilodalton
M	mole
MCA	Milk Clotting Activity
MCE	Milk Clotting Enzyme
mg	milligram
$MgSO_4. 7H_2O$	magnesium sulfate anhydrate
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimole
$MnSO_4. H_2O$	manganese (II) sulfate monohydrate
MRS	Man, Rogosa and Sharpes

M.W	molecular weight
Na_2CO_3	sodium carbonate
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
PA	Proteolytic Activity
PCR	polymerase chain reaction
RC	regenerated cellulose
RNA	ribonucleic acid
S	substrate solution
sec	second
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide
SU	soxhlet units
TPA	texture profile analysis
TCA	trichloroacetic acid
u	unit
UV	ultraviolet
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
α-la	α-lactalbumin
β-lg	β-lactoglobulin
µg	microgram