Name of Candidate: Heba Hamed Bayomy Maghrawy **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Induction of Azoreductase from *Aeromonas hydrophila* for Biological Treatment of Dyes in Wastewater
Supervisors: Dr. Samir Abd-El Wahed El Gizawy
Dr. Refae Ibrahim Refae
Dr. Hussein Abdel Kareem Ahmed
Department: Agricultural Microbiology
Approval : / / 2011

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate textile dyes degradation by novel bacterial strains isolated from different local sources. Twenty two isolates of *Aeromonas* species were isolated from different local sources. Among those, seven showed the ability to decolorize Congo red in nutrient broth medium after 48 h incubation. The only one isolate from fish (AF) showed the highest efficiency in decolorization (98%). This isolate was identified as *Aeromonas hydrophila* (AF) based on Gram staining, morphology characters, biochemical tests and the 16S rRNA sequencing. Color removal was highest in microaerophilic culture of pH 7 at 30 ^{o}C. The isolate was able to decolorize sulphonated azo dye (Congo red) in a wide range (up to 50 ppm). This isolate could also decolorize the medium containing different types of azo dyes after 48 h incubation. High concentration of yeast extract (as a N-source) did not enhance strongly the decolorization efficiency. Similarly, carbon source inhibited decolorization activity because the consumed carbon was converted to organic acids that might decrease the pH of the culture medium, thus inhibiting the cell growth and decolorization activity. The isolate was capable to decolorize in the presence of NaCl concentrations up to 10 g/l. The biodegradation was monitored by UV–vis, IR spectroscopy and TLC. Azoreductase has shown to be inducible extracellular, flavoprotein and use NADH as electron donor. Sequential microaerophilic, aerobic and physical (radiation) treatment seemed the most logical strategy for the complete removal of azo dyes in biological systems. The phytotoxicity study revealed the degradation of Congo red into non-toxic product by *Aeromonas hydrophila* (AF).

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Congo red, degradation of azo dyes, azoreductase, phytotoxicity.

Name of Candidate: Deiaaeldin Abdel Monem Gadel Rab Hassanein **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis : Using Novel Starters for Improving Functional Properties of Fermented Dairy Products.
Supervisors: Dr. Olfat Sayed Mahmoud Barakat
Dr. Moawad Kamel Zahra
Dr. Gamal Ahmed Ibrahim
Department: Agricultural Microbiology **Approval: / /2011**

ABSTRACT

Starters play an important role in the manufacture of dairy products in terms of impact factor on the organoleptic and technological characteristics of the final product. Lactic acid bacteria (LAB) were isolated and characterized by using phenotypic (cell morphology, Gram staining, physiological and biochemical tests) and genotypic methods (PCR). The results were *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (isolate 401) and *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* (isolate441).The maximum specific growth rates of selected isolates 401 and 441 was significantly different compared to other isolates in MRS broth at different tested temperatures. Growth of 441 and 401 were more resistant to salt and high acidity, Survived at 60°C and tolerated bile and salt. Generally, the viability is not affected when isolates are incubated with hydrochloric acid at pH 3.5 or higher, while at lower pH the survival decreases to less than 1%, In addition, the strains 401 and 441 had the best survival capacities at pH (1.5 and 2), they survived under low pH conditions for 6 h and they tolerated well the low pH under in vitro conditions even at concentrations higher than those previously used by other authors. Acid tolerance of bacteria is an important factor to assure their resistance of gastric stresses where used as dietary adjuncts in acid foods.

The new method was studied for enhancing the long-term survival of LAB by decreasing the lethal effects of environmental stresses and process conditions, and consequently favoring the delivery to the host. It was observed that the enhanced growth of *Lactobacillus paracasei* 441 in continuous biofilm culture could improve the survival with suitable dilution rate. We employed chelator that is known to be able to chelate iron from the growth medium using Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), with different concentrations added to culture medium. The presence of EDTA in the growth media resulted in 1000-fold increased survival of *L. para*casei 441, when subsequently exposed for 180 min to low pH 2.0 and 1.5 compared to controls (pH 7). We can conclude from our comparative analysis that the intrinsic biofilm formation capacity of *L. paracasei* 441 is strongly dependent on environmental factors and the culture medium used.

Changes in the viable counts of all treatments used in the manufacture of white cheese with different salt concentrations or fermented milk during storage, suffered a slight decline in *L. paracasei* 441 numbers in all treatments during 60 days of storage, the cells decreased by an average of one logarithmic cycle (at 20°C and at 4°C). Depending on method of cell production batch or continuous biofilm cultures, we could notice that the viability and stability are better in treatments with cells came from biofilm more than cells came from batch by at least one log .Generally, the survival of *L. paracasei* 441produced from biofilm continuous cultures gained tolerant response which improved cell stability more than cells produced by batch to environmental hard and toxic stress conditions.

Key words: Domiati cheese, starter cultures, biofilm, continuous biomass production, dairy products.

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية: الزراعة **القسم : الميكروبيولوجيا الزراعية**

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

2 - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :_

الجودة الميكروبيولوجية والكيماوية للخميرة الجافة النشطة

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

Microbiological and Chemical Quality of Active Dry Yeast

التخصص الدقيق : **ميكروبيولوجيا الأغذية و العمليات الصناعية**

تاريخ المناقشة :**2011/3/29**

3 - بيانات الطالب :

الاسم : **عبدالرحمن صالح زكي أحمد** الجنسية : **مصرى** النـوع :**ذكر**

العنوان : **1 شارع الشيماء ، الواحات البحرية ، محافظة 6 اكتوبر .**

رقم التليفون :**0117319868**

جهة العمل :**قسم الميكروبيولوجيا الزراعية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة**

البريد الإلكترونى :**abdelrahmansz@live.com**

4 - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
1 أ.د/ زكريا يحيى ضو	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة
2 أ.د/ معوض كامل زهرة	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة
3 د. نصر فوزي نصر	الميكروبيولوجيا الزراعية	الزراعة	القاهرة

5 - مستخلص الرسالة (Abstract)

5 - 1 باللغة العربية :

الكلمات الدالة :

(خميرة الخباز ، *Saccharomyces cerevisiae* ، الخمائر الجافة النشطة ، التريهالوز، قوة الرفع ، إنتاج الخميرة).

الطلب المتزايد على خميرة الخباز يدعو لبذل المزيد من الجهد لضمان سلامة وأمن هذا المنتج الغذائي وكذلك كفاءته التخميرية. و قد أجريت هذه الدراسة لتقدير المحتوى الميكروبي لعدد 9 أنواع تجارية مختلفة من الخميرة الجافة النشطة مقارنة بالخميرة المضغوطة المصرية. وفي هذا الصدد ، سجلت الخميرة المضغوطة أسوأ النتائج حيث احتوت جميع العينات على أعداد هائلة من بكتيريا القولون الكلية و المعوية على حد سواء، كما أن 50 ٪ من العينات كانت تحتوي على الـ Salmonella. من ناحية أخرى سجلت الخمائر الجافة النشطة نتائج أفضل نسبيا حيث كانت نسبة العينات غير المطابقة للمواصفات بسبب وجود بكتيريا القولون الكلية 23.3 ٪، بينما ظهرت بكتيريا القولون المعوية في 17.8 ٪من العينات، فيما لم تلاحظ الـ Salmonella الا في 4.4 ٪ من اجمالي العينات.

من المعلوم أن قدرة الخميرة على التخمير بكفاءة عالية يعتمد بشكل أساسي على حيويتها وتركيبها الكيميائي. وقد أظهرت نتائج الدراسة أن نسبة الخلايا الحية في الخميرة المضغوطة كانت 96.9% بينما تراوحت هذة النسبة من 23 إلى 78.3 ٪ في الخمائر الجافة النشطة. من ناحية أخرى ، أظهرت النتائج أن جميع العينات احتوت على قدر لا بأس به من الدهون والبروتينات و السكريات الكلية، بينما تراوحت نسبة سكر التريهالوز – و الذي يعتقد في أن له دورا هاما في حماية الخلايا الحية من تأثير حرارة التجفيف – بين 7.89 و 28.8 ٪.

لعل أهم ما تقوم به الخميرة في صناعة الخبز هو إنتاج غاز ثاني أكسيد الكربون والذي يؤدي بدوره الى رفع العجين لإنتاج الرغيف المفضل لدى المستهلكين. لهذا تم تقييم قوة الرفع للأنواع المختلفة من الخميرة والتي تبين تفاوتها بشكل كبير، ففي حين سجلت الأنواع الانجليزية والصينية نتائج جيدة حتى في الساعة الأولى من التخمير، جاءت نتائج الأنواع المصرية منخفضة الى حد بعيد. من جهة أخرى اهتمت الدراسة بتحديد درجة الحرارة المثلى للتخمير الخاصة باللأنواع المختلفة من الخميرة، و كذلك كمية الخميرة المطلوب اضافتها للعجين، بالاضافة الى تأثير اضافة الملح والسكر بتركيزات مختلفة على قوة الرفع. أظهرت النتائج أن معظم الأنواع أعطت أعلى قوة رفع في مدى ضيق من درجات الحرارة كان في حدود 35 أو 40 درجة مئوية، بينما تمكنت بعض الأنواع من اعطاء نفس قوة الرفع تقريبا في مدى واسع من درجات الحرارة تراوح بين 35 و 45 درجة مئوية. أشارت النتائج إلى وجود علاقة طردية بين كمية الخميرة المضافة الى العجين و قوة الرفع بينما كانت العلاقة سلبية بين تركيز الملح وقوة الرفع. علاوة على ذلك ، أشارت النتاج الى أن اضافة السكر إلى العجين بنسبة تصل إلى 1.5 ٪ قد تحسن من قوة الرفع لبعض أنواع الخميرة بنحو 25 ٪.

لتحديد الظروف الأكثر ملاءمة لإنتاج خميرة الخباز. تم عزل 4 سلالات S. cerevisiae من الخمائر التجارية المختلفة. تم بعد ذلك اختبار العزلات لخمس عوامل شملت كمية اللقاح وتركيز المولاس و تركيز اليوريا ودرجة الحموضة و سرعة الرج. وقد أوصت النتائج باعداد بيئة التخمير بحيث تحتوي على 10 ٪ سكر و 0.15 ٪ يوريا مع ضبط درجة الحموضة على 5 وتركيز اللقاح بحيث يصل الى 1000 خلية / مل. ثم التحضين على درجة حرارة 30 °م لمدة 24 ساعة في محضن هزاز يعمل بسرعة 150 دورة في الدقيقة.

5 – 2 باللغة الأجنبية :

(Key Words: *Saccharomyces cerevisiae*, microbiological quality, viability, rising power, trehalose, baker's yeast production).

There is an increasing demand for baker's yeast to satisfy the needs of over growing population. This necessitates that efforts be made to ensure their hygienic suitability and functional quality. This study was, therefore, executed to monitor the microbial content of 9 different brands of active dry yeast (ADY) and the Egyptian compressed yeast. In this regard, the compressed yeast recorded the worst microbiological quality where all samples contained a massive amount of total and faecal coliforms as well as 50% of samples contained *salmonella*. On the other hand, ADY recorded better result as percentage of unacceptable samples; total coliforms (23.3%), faecal coliforms (17.8%) and *Salmonella* (4.4%).

The leavening ability of yeast depends on its viability and chemical composition. Concerning yeast cell viability, the compressed yeast revealed the highest viability (96.9%) while the viability of ADY brands ranged from 23 to 78.3%. All samples contained fair amounts of lipids and proteins while the intracellular trehalose - which generally believed to be a critical parameter for its resistance to stress such as drying - ranged from 7.89 to 28.8%.

The most important role of yeast in bread making is raising the dough to produce the characteristic loaf preferred by consumers. Therefore, evaluating the rising power (RP) and the main parameters affecting the RP includes; temperature, amount of yeast, salt and sugar concentrations were considered. Findings of this study recorded far difference in RP between the local and imported brands especially those from UK and China. Most brands required a specific temperature (35 or 40° C) to give the maximum RP while some brands gave almost the same RP value in wide range of temperatures. Results indicated a positive correlation between yeast amount and RP while a negative correlation between salt concentration and RP was occurred. Furthermore, adding sugar up to 1.5% to the dough did improve the RP of some brands by 25%.

It was rather interest to investigate the most efficient conditions for baker's yeast production. Thus, 4 strains of *Saccharomyces cerevisiae* were isolated from different commercial ADY. The Isolates were tested for five parameters including initial yeast level, molasses concentration, urea requirements, pH-value and agitation speed. The results recommend adjusting the cultivation medium at 10% sugar with 0.15% urea at pH 5. The medium was then inoculated by the yeast strain to obtain the initial count of 10^3 cells / ml. Then the flasks were incubated in orbital shaker (150 rpm) at 30°C for 24 hours.

6 – <u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u> :

6- 1. الخميرة المصرية المضغوطة تحتوي على ميكروبات ممرضة وبأعداد كبيرة جدا مما يجعلها غير امنة لإستهلاك الادمي.

6 - 2. الأنواع المصرية والمعبأة في مصر من الخميرة الجافة النشطة غير مطابقة لمواصفات الجودة الميكروبيولوجية كما أن نسبة حيوية خلايا الخميرة فيها تعد منخفضة جدا حيث وصلت لأقل من 25% في بعض الأنواع.

6 - 3. الخميرة الجافة النشطة التركية تعد امنة نسبيا من الناحية الميكروبيولوجية الا أنها أنها بحاجة الى التطوير لزيادة نسبة الخلايا الحية في الجرام والتي تراوحت بين 50 و 60%.

6 - 4. نسبة الحيوية في الخميرة الجافة النشطة الصينية كانت جيدة الا أنها كانت دون المستوى المطلوب من الناحية الميكروبيولوجية لاحتوائها على نسبة عالية من الفطريات والـ *Staphylococcus aureus*.

6 - 5. جاءت الخميرة الجافة النشطة الإنجليزية مطابقة تماما للمواصفات القياسية العالمية من حيث السلامة والأمان للإستهلاك الادمي كما احتوت على نسبة حيوية مرتفعة.

6- 6. قوة رفع الخميرة للعجين كانت منخفضة جدا في الأنواع المصرية والمعبئة في مصر بينما كانت متوسطة في الأنواع التركية وجيدة جدا في الأنواع الإنجليزية والصينية. تجدر الإشارة الى أن الأسعار للأنواع المختلفة متقاربة جدا رغم التفاوت الكبير جدا في الكفاءة التخميرية.

6- 7. قوة التخمير تتحسن بنسبة تتراوح بين 15 و 25% لبعض أنواع الخميرة عند اضافة السكر بنسبة 1,5% بينما تبدأ في الإنخفاض اذا زادت نسبة السكر عن 1,5%.

6- 8. ينصح بإضافة أقل كمية ممكنة (1%) حيث تتأثر قوة الرفع سلبيا بإضافة الملح للعجين.

6- 9. استخدام الأنواع الجيدة من الخميرة الجافة النشطة يمكن أن يقلل زمن التخمير و كمية الخميرة المضافة بنسبة تصل الى 50%.

6- 10. يؤثر التركيب الكيميائي لخلايا الخميرة (خاصة نسبة سكر التريهالوز) على حيوية الخميرة بعد التعرض لحرارة التجفيف.

6- 11. الظروف الإقتصادية المثلى لإنتاج الخميرة متقاربة للسلالات المختلفة وتتلخص في اعداد بيئة التخمير بحيث تحتوي على 10 ٪ سكر و 0.15 ٪ يوريا مع ضبط درجة الحموضة على 5 وتركيز اللقاح بحيث يصل الى 1000 خلية / مل. ثم التحضين على درجة حرارة 30 °م لمدة 24 ساعة في محضن هزاز يعمل بسرعة 150 دورة في الدقيقة.

7 - ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

1 وزارة التجارة والصناعة

2 وزارة الزراعة واستصلاح الأراضى

3 وزارة الاستثمار

4 مصانع الخميرة

5 جهاز حماية المستهلك

6 شركات ومصانع الأغذية التي تستخدم خميرة الخباز

8 - هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** ☐ **لا** ☑

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

8 - 2

8 - 3

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☐

تعاون أكاديمى ☐

مشروع ممول من جهة ثالثة ☐ (اذكر ما هى :)

أخرى ☐ (تذكر)

9 - هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :

لا ☐ **(لماذا)**

نعم ☑

(I) لتطبيق البحث : ☑

(II) لاستكمال البحث : ☑

(ج) أخرى ☐ **(تذكر)**

10 - هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

10 - 1 . **Microbiological quality of Active Dry and compressed Baker's Yeast Sold in Egypt**
JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, October 2010. Vol. 4(2), p. 455-462

10 – 2. تقدير الجودة الميكروبيولوجية لخميرة الخباز الجافة النشطة والمضغوطة في السوق المصري (مستخلص عربي و ملصق علمي)
ورشة عمل (التقانات الحيوية الصناعية . الوضع الحالى والافاق المستقبلية)
14- 15/ 7/2010 المركز القومي للبحوث – مصر.

10 – 3. Microbiological quality of Active Dry and compressed Baker's Yeast sold in Egypt (Abstract and Poster presentation)
1st International Congress on Food Technology 4 - 7/11 / 2010. Antalia, Turkey

10- 4. Easy and efficient method for measuring the rising power of the baker's yeast (Full paper and Poster presentation)
Novel Approaches in Food Industry" 26-29 May, 2011. Cesme, Izmir, Turkey.

10- 5. Five major factors affecting the production of baker's yeast in molasses medium (Full paper and Poster presentation)
Novel Approaches in Food Industry" 26-29 May, 2011. Cesme, Izmir, Turkey.

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

لا

12 - <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