



تطوير وتقييم أغذية ومشروبات الألبان الوظيفية

رسالة مقدمة من

ولاء محمد سعد بهنس

بكالوريوس في العلوم الزراعية (البان) – كلية الزراعة – جامعة الفيوم (2012)

ماجستير في العلوم الزراعية (البان) – كلية الزراعة – جامعة الفيوم (2020)

كجزء من متطلبات الحصول على

درجة دكتوراة الفلسفة في العلوم الزراعية (ألبان)

قسم الألبان

كلية الزراعة – جامعة الفيوم

لجنة الحكم والمناقشة:

1. أ.د/ علي إبراهيم علي منصور

أستاذ الألبان المتفرغ – قسم الألبان – كلية الزراعة – جامعة الأزهر – فرع أسيوط

2. د/ رتيبة بيومي أحمد

أستاذ الألبان المساعد – قسم الألبان – كلية الزراعة – جامعة الفيوم

3. أ.د / خالد عبد الحكم عبد السلام (مشرفاً رئيسياً)

أستاذ الألبان – قسم الألبان – كلية الزراعة – جامعة الفيوم.

تاريخ المناقشة: 2024 /9/4



تطوير وتقييم أغذية ومشروبات الألبان الوظيفية

رسالة مقدمة من

ولاء محمد سعد بهنس

بكالوريوس في العلوم الزراعية (البان) – كلية الزراعة – جامعة الفيوم (2012)

ماجستير في العلوم الزراعية (البان) – كلية الزراعة – جامعة الفيوم (2020)

كجزء من متطلبات الحصول على

درجة الدكتوراة في العلوم الزراعية (البان)

قسم الألبان

كلية الزراعة – جامعة الفيوم

تحت إشراف كل من:

1. أ.د / خالد عبد الحكم عبد السلام (مشرفاً رئيسياً)

أستاذ الألبان – قسم الألبان – كلية الزراعة – جامعة الفيوم

2. د/ نسرين محمد نصر (مشرفاً)

أستاذ الألبان المساعد – قسم الألبان – كلية الزراعة – جامعة الفيوم

تاريخ المناقشة: 2024/9/4

الخلاصة

تهدف هذه الرسالة إلى تطوير وتقييم جودة مشروب لبنى متخمّر بسلالة بروبيوتيك جديدة مدعم ببذور البريلا والسيلليوم وذلك باستخدام سلالة بروبيوتيك جديدة معزولة من منتجات الألبان المتخمرة المصرية التقليدية. وقد تضمنت هذه الرسالة ثلاثة أجزاء رئيسية وهي على النحو التالي:

الجزء الأول: تضمنت هذه الدراسة عزل وتعريف وتوصيف سلالات البروبيوتيك المحتملة من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من منتجات الألبان المتخمرة التقليدية الأكثر استهلاكاً في مصر، وتحديد اللبن الرايب، لبن خض، جبن قريش. ومن إجمالي 25 عزلة تم تحديد 14 عزلة فقط (أي ما يعادل 56%) على أنها موجبة لجرام، غير متجرّثة، غير متحركة، سالبة للكثايز. وأظهرت هذه العزلات القدرة على النمو على درجة حرارة 15-45°م، وكذلك في الأوساط التي تحتوي على 4% ، 6.5% كلوريد الصوديوم. وأظهرت غالبية العزلات نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد مسببات الأمراض البكتيرية التي تم فحصها. وتم اختيار 4 عزلات LAB وهي الأكثر مثالية (LAB-3، LAB-4، LAB-، LAB-13، وLAB-14)، لتعريفها باستخدام 16S rDNA، وتم تقييمها خصائصها البروبيوتيك. وكشفت شجرة التعريف والتطور phylogenetic أن العزلة LAB-3 أظهرت تطابقاً وراثياً مع *Enterococcus durans* MT545074.1 ، بينما أظهرت LAB-4 تشابهاً مع *Enterococcus lactis* MH348130.1 ، LAB-13 تماثلاً مع *Lactobacillus acidophilus* MT604714.1 ، بينما أظهرت LAB-14 تشابهاً مع *Leuconostoc mesenteroides* MT538672.1. وأظهرت الأربع سلالات المختارة حساسية للمضادات الحيوية. *Enterococcus durans* ، *L. acidophilus* تمكنوا من البقاء تحت درجة الحموضة المنخفضة. علاوة على ذلك، أظهرت السلالتان المذكورتان مرونة في كلا الظروف الحمضية البالغة 2.0، 3.0. وأيضاً البقاء عند تركيزات 0.1%، 0.3%، 0.5% من أملاح الصفراء.

الجزء الثاني: يهدف لدراسة تأثير إضافة بذور السيلليوم والبريلا بنسب مختلفة (1، 1.5، 2%) على الرقم الهيدروجيني وحيوية عزلات البروبيوتيك المختارة *Ent. durans* ، *L. acidophilus* وذلك في أوساط مختلفة (اللبن ، في MRS، في محاكاة الجهاز الهضمي معملياً) عند صفر، 12، 24 ساعة. وأوضحت النتائج أن *Enterococcus durans* و *L. acidophilus* الذي يحتوي على 1.5% بذور بريلا أعلى حيوية في كلا من بيئة MRS واللبن الخالي من الدسم عند 24 ساعة تليها جميع المعاملات التي تحتوي على 1.5% بذور بريلا أو سيلليوم لكل من البروبيوتيك المختبرة. وأظهرت محاكاة الجهاز الهضمي أن أعداد البكتيريا البروبيوتيك انخفضت في جميع العينات خلال الثلاث مراحل الجهاز الهضمي (المعدة والاثنى عشر والأمعاء)، ولكن المعاملات التي تحتوي على بذور البريلا أو السيلليوم كانت لها أقل الانخفاضات مقارنة بالكنترول.

الجزء الثالث: واستناداً إلى النتائج السابقة في الجزء الثاني، تم تطوير إنتاج مشروب لبنى متخمّر بـ *Enterococcus durans* كبداءى بروبيوتيك (كنترول) مع التدعيم 1% بذور سيلليوم، 1% بذور بريلا، وخليط من 0.5% سيلليوم و0.5% بذور بريلا. وتم تخزين المنتج على 5°م لمدة 14 يوم، وأجراء تحليل التركيب الكيميائي للمنتج عندما يكون طازجاً، وتقدير المحتوى الفينولي الكلي، ونشاط الأكسدة وفصل الشرش والتأكد من حيوية *Enterococcus durans* والتقييم الحسي للمنتج خلال التخزين على 5°م عندما يكون 0، 7، 14 يوماً. وأظهرت النتائج زيادة معنوية في المواد الصلبة الكلية والبروتين والدهون والرماد والمحتوى الفينولي الكلي ونشاط مضادات الأكسدة في المعاملات التي تحتوي على بذور السيلليوم أو البريلا. وسجل مشروب اللبن المتخمّر المضاف إليه 1% بذور البريلا عند عمر 7 أيام أعلى حيوية لـ *Enterococcus durans* (255.80×10^9 cfu/ml). وبذور السيلليوم عززت بشكل كبير القدرة على

الاحتفاظ بالماء ومنع انفصال الشرش. ومن الناحية الحسية أدى استخدام السيلليوم أو البريلا بمستوى 1% إلى تحسين ملحوظ في قوام المنتج دون أن يكون له تأثير سلبي على الخواص الحسية للمنتج.

الكلمات الدالة: عزل، تعريف، بروبيوتيك، بريبيوتيك، بذور البريلا، بذور السيلليوم، *Enterococcus*

Lactobacillus acidophilus durans

الملخص العربي

تطوير وتقييم أغذية ومشروبات الألبان الوظيفية

تعرف الأغذية والمشروبات الوظيفية Functional foods and beverages هي أغذية تقليدية تتمتع بقدرة علي تعزيز الصحة العامة للإنسان لما توفره من مكونات نشطة حيوية bioactive compounds بما في ذلك البكتريا الداعمة للحوية ومنشطات البكتريا الداعمة للحوية وغيرها من المكونات النشطة التي تدعم الصحة العامة للمستهلك وتحسين من الخصائص الحسية للمنتج، وتعمل هذه الأغذية علي تعظيم الوظائف الفسيولوجية للإنسان وتعزيز جهاز المناعة وقليل المخاطر والحماية من ارتفاع ضغط الدم والسكري والسرطان وهشاشة العظام وأمراض القلب. ومع تطور المجتمعات الحديثة وتطور أنماط الحياة وزيادة الاهتمام بالصحة يتزايد الاهتمام بتطوير أغذية ذات فوائد صحية وذلك لتلبي تطلعات المستهلكين الذين يهتمون بشراء هذه الأغذية. وتحتل منتجات ومشروبات الألبان الوظيفية Functional dairy and beverages products مكانة بارزة في قطاع الأغذية الوظيفية، وتمثل أكثر من 40% من هذا السوق. والغالبية العظمى منها مشروبات ومنتجات لبنية مخمرة.

ويعد تطوير منتجات غذائية وظيفية جديدة مشتقة من منتجات الألبان ومدعمة بالبكتريا الحوية والبذور والحبوب النباتية لإثراء الفوائد الصحية والغذائية للمنتجات اللبنية ذات اهتمام كبير للباحثين ورجال الصناعة وذلك استجابة للأعداد المتزايدة من المستهلكين المهتمين بتحسين صحتهم، وغالبًا ما يتم إنتاج لبن مخمر بروبيوتيك باستخدام أجناس من *Lactobacillus*، *Bifidobacterium* والتي تستخدم بشكل واسع في إنتاج العديد من المنتجات الوظيفية الحوية المخمرة، وعملية البحث عن سلالات جديدة لها خصائص حيوية لاستخدامها في تطوير مشروبات واغذية حيوية تمثل أمرًا مهمًا للغاية لكل من شركات الأغذية والمستهلكين.

لذا هدفت هذه الدراسة إلى:

1. عزل سلالات حيوية جديدة من بكتريا حامض اللاكتيك من منتجات لبنية مخمرة مصرية تقليدية وتعريفها عن 16s rDNA وتقييم خصائصها الحيوية في المختبر.
 2. تقييم حيوية بعض السلالات البكتيرية المختارة وهي *Lactobacillus acidophilus*، *Enterococcus durans* في أوساط مختلفة (في اللبن، بيئة MRS، عمل محاكاة للجهاز الهضمي معملية) في وجود بذور البريلا وبذور السيلليوم كمنشطات البكتريا الداعمة للحوية.
 3. تطوير انتاج مشروب لبني مخمر جديد باستخدام *Enterococcus durans* مدعم بذور السيلليوم أو البريلا كمنشطات للبكتيريا، ودراسة تأثيرها على بعض الخواص الفيزيوكيميائية، المحتوى الفينولي الكلي، ونشاط مضادات الأكسدة، وحيوية البكتريا، والتقييم الحسي للمنتج خلال فترة التخزين لمدة 14 يوم.
- واشتملت الدراسة على ثلاثة أجزاء وهما:

الجزء الأول: عزل وتوصيف وتعريف عزلات جديدة من البكتريا الداعمة للحوية المعزولة من منتجات الألبان المصرية التقليدية

هدفت هذه الدراسة الي عزل وتوصيف وتعريف سلالات البكتريا الداعمة للحوية المحتملة وتقييم الخصائص الحيوية للسلالات المعزولة من 15 عينة من منتجات الألبان المخمرة التقليدية (لبن رائب، لبن خض، جبن قريش).

تم عزل 25 سلالة من بكتريا حامض اللاكتيك، وتم اختيار أفضل أربع سلالات وهما LAB-3، LAB-4، LAB-13، LAB-14 لتعريفها بواسطة التسلسل الجيني 16s rDNA، وتقييمها خصائصهم الداعمة للحوية. وأظهرت التحليلات الآتي:

1. **بفحص الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية والفسولوجية لعزلات بكتيريا حامض اللاكتيك** وجد ان 14 سلالة من اصل 25 سلالة كانت موجبة لجرام، غير متجترمة، غير متحركة، سالبة لنشاط الكتاليز، وكانت مستعمراتها بيضاء صغيرة، مستديرة إلى بيضاوية الشكل وعصوية.
2. **تجبن اللبن:** تم اختبار قدرة الـ 14 سلالة علي تجبن اللبن عند 37°م لمدة 12، 24، 38 ساعة، فكانت جميع عزلات LAB الـ 14 باستثناء LAB-1، LAB-7، تجبن اللبن بعد 16 ساعة. تختلف قدرة السلالات على تجبن اللبن. من بين 14 عزلة، أنتجت 8 عزلات فقط لبناً متجبناً خلال 8 ساعات. تراوحت قيم الرقم الهيدروجيني من 6.4 إلى 4.2 مع كل السلالات المختبرة بعد 8 ساعات.
3. **النمو في درجات الحرارة المختلفة:** تم اختبار جميع العزلات عند 15، 37، 45°م ووجد أن 11 سلالة من أصل 14 سلالة قادرة على البقاء على قيد الحياة على هذه درجات الحرارة.
4. **النمو في تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم:** نمت جميع السلالات المختبرة في بيئة MRS المضاف إليها تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم (0، 4، 6.5، 10%) بشكل جيد (++) . وجد ان عشر سلالات فقط هي التي نمت في تركيز 10% من كلوريد الصوديوم.
5. **النشاط المضاد للميكروبات ضد مسببات الأمراض:** استناداً إلى نتائج اختبار النشاط المضاد للميكروبات، ثبت أن المستخلص لكل عزلة تثبط نمو جميع مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء المختبرة، باستثناء LAB-5 الذي لم يثبط *Bacillus cereus*، وجد ان LAB-3، LAB-4، LAB-13، LAB-14 لها تأثيرات مضادة قوية على *Staph. aureus*.
6. **التعريف الجزيئي للعزلات LAB**
بعد مراجعة النتائج السابقة، تم اختيار أفضل أربع سلالات لإجراء التعريف الجزيئي للسلالات باستخدام 16s rDNA. وكشف تحليل شجرة التطور phylogenetic tree أن السلالة LAB-3 لها تشابهات وراثية مع البكتيريا المعوية من نوع *Enterococcus durans* MT545074.1، بينما السلالة LAB-4 لها تشابهات وراثية مع *Enterococcus lactis* MH348130.1، في حين أن السلالة LAB-13 متماثلة وراثياً مع *Lactobacillus acidophilus* MT604714.1 في حين أظهرت LAB-14 تشابهاً مع *Leuconostoc mesenteroides* MT538672.1.
7. **تقييم الخصائص الحيوية للسلالات البكتيرية المعرفة Probiotic properties**
1. **الحساسية للمضادات الحيوية**
أظهرت بعض السلالات التي تم تعريفها مقاومة بدرجات متفاوتة والبعض الآخر كان حساس لجميع المضادات الحيوية المختبرة (البنسلين، الكلورامفينيكول، والاريثروميسين، والتتراسيكلين، والفانكوميسين).
2. **تحمل درجة الحموضة المنخفضة**
تم فحص السلالات الأربعة التي تم اختيارها وأظهرت أنماطاً مختلفة من تحمل الحمض عند قيم الرقم الهيدروجيني 2، 3، 4. وكانت اثنتان منها مقاومة للرقم الهيدروجيني المنخفض حيث أظهرت سلالة *L. acidophilus* و *Ent. durans* حيوية بنسبة تزيد عن 99% عند الرقم الهيدروجيني 4.0. وأظهر أكثر من 60% من العزلات الأخرتين أن لهم القدرة على البقاء. بمقارنة *Ent. lactis* و *Leu. Mesenteroides*، وأظهرت *Ent. durans* و *Lb. acidophilus* تحملاً فائقاً عند درجة حموضة 2.0 و 3.0. مع معدلات البقاء على قيد الحياة من 72.33%، 64.56% عند درجة الحموضة 2.0.
3. **تحمل الأملاح الصفراوية**
تم اختبار السلالات الأربعة التي تم اختيارها وأظهرت أنماطاً مختلفة لتحمل الأملاح الصفراوية عند تركيزات 0.1، 0.3، 0.5 من الأملاح الصفراوية. وتتميز *L. acidophilus* بمرونة عالية، حيث تصل معدلات بقائها على قيد الحياة إلى 145.00% و 120.33% و 94.66% عند تركيزات الأملاح الصفراوية المختلفة. ومع تركيز 0.1 من الأملاح الصفراوية تأقلمت جميع العزلات الأربعة على الأملاح الصفراوية.
- وكانت النتائج التي توصلنا إليها أن الأربع سلالات التي تم اختبارها سلالات داعمة للحياة (بروبيوتك) واعدة لإنتاج منتجات غذائية وظيفية.

الجزء الثاني : التأثير المنشط لبذور البريلا وبذور السيلليوم بنسبة مختلفة (0،1،1.5،2%) على حيوية *Enterococcus durans* ، *Lactobacillus acidophilus* في بيئة MRS واللبن الخالي الدسم ومحاكاة ظروف الجهاز الهضمي معمليا

تم دراسة حيوية *L. acidophilus* and *Ent. durans* في بيئة MRS واللبن خالي الدسم بعد اضافة تركيزات مختلفة من بذور البريلا والسيلليوم (0،1.0،1.5،2.0 %) وتقييم الحيوية والرقم الهيدروجيني خلال صفر و12 و24 ساعة من التحضين. وتم اختيار أفضل المعاملات التي تحقق أعلى حيوية للـ probiotic bacteria المختبرة (وكانت 1.5%) وتعرضها لظروف تحاكي الجهاز الهضمي في المختبر.

• في بيئة الـ MRS

اثبتت الدراسة أن وجود بذور البريلا أو سيلليوم أدى إلى تحسين كبير في نشاط البكتيريا المدعمة الحيوية والرقم الهيدروجيني. وأظهرت النتائج أعلى حيوية لبكتيريا *Ent. durans* عند تركيز 1.5 % من مستخلص بذور البريلا في حين أظهرت *L. acidophilus* أعلى حيوية على 1.5 % من مستخلص بذور السيلليوم. وأشارت النتائج إلى انخفاض طفيف في مستويات الرقم الهيدروجيني، كانت أدنى قيمة للرقم الهيدروجيني 4.11 بالنسبة لبيئة MRS الكنترول الملقح بـ *Ent. durans* ، 4.38 لبيئة MRS الكنترول الملقح بـ *L. acidophilus*.

• في اللبن منزوع الدسم

تكشف الدراسة أن بذور السيلليوم والبريلا أدت إلى تحسين بشكل كبير في أعداد البكتيريا الداعمة للحيوية، حيث سجل اللبن الملقح بـ *Ent. durans* ، 1.5% من بذور بريلا أعلى عدد (368.66 × 10⁸ ميكروب/مل) بعد 24 ساعة من التحضين. في حين يحتوي اللبن الملقح بـ *L. acidophilus* والمدمع بـ 1.5% بذور بريلا على عدد أكبر من *L. acidophilus* قدره 322.33 × 10⁸ ميكروب/مل).

واظهرت النتائج أن وقت التحضين كان له تأثير معنوي على حيوية *Ent. durans* في وجود البريلا والسيلليوم، وكان لوقت التحضين التأثير الأعلى في الحيوية بعد 24 ساعة، بينما كانت أقل حيوية عند بداية التحضين.

• تحت ظروف محاكاة الجهاز الهضمي معمليا

تم تقييم حيوية البكتيريا في وجود 1.5% من بذور السيلليوم والبريلا من خلال محاكاة الجهاز الهضمي. تم عمل محاكاة للأجزاء الثلاثة من الجهاز الهضمي (المريء/المعدة والاثني عشر والامعاء) في المعمل وتم تقييم حيوية البكتيريا المدعمة الحيوية في كل خطوة بمجرد تحضير كل دورق مخروطي بنفس الطريقة بعد إضافة 1.0 جم من العينة، 9.0 مل من ماء الببتون، ثم تم وضع كل منهما تحت ظروف مماثلة للجهاز الهضمي.

أ. استخدم 25 ملجم/ مليلتر من البيبسين في مرحلة المريء والمعدة، وأضيف 0.05 مل/لتر في مرحلة المعدة وتم ضبط pH في ست خطوات. بعد إزالة دورق مخروطي واحد ثم تم العد للبكتيريا المتبقية تحت ظروف المعدة.

ب. خطوة الاثني عشر بعد إضافة البنكرياتين والإنزيمات الصفراوية (0.25 مل/لتر) وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 5.0، واجريت هذه المرحلة على 45 لفة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة، ثم تم إزالة الدورق المخروطي الثاني وتتوافق هذه الظروف مع مرحلة الاثني عشر، وتم قياس حيوية البكتيريا المتبقية في العينة.

ج. خطوة الامعاء تم زيادة الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 عند 90 لفة في الدقيقة لمدة 90 دقيقة. أخيراً، تم اخذ الدورق المخروطي الأخير لقياس حيوية البكتيريا المتبقية تحت هذه الظروف

أوضحت الدراسة بقاء *Ent. durans* وكذلك *L. acidophilus* في اللبن المتخمّر المضاف إليه بذور السيلليوم والبريلا في ظل ظروف المحاكاة للجهاز الهضمي. أظهرت جميع المعاملات نتائج مقبولة حيث حسنت البذور حيوية البكتيريا في مرحلتي المعدة والاثني عشر. وأظهرت النتائج أن معاملة الكنترول *Ent. durans* كانت لها أعلى نسبة انخفاض في المرحلة الثانية (الاثني عشر) في حين كانت *L. acidophilus* مع بذور البريلا 1.5% هي الأقل في نسبة الانخفاض أي انها المعاملة

ذات الحيوية الأعلى. وأشارت النتائج أيضاً إلى أن أعلى انخفاض في الحيوية قد لوحظ في المرحلة النهائية (اللفافي) مع معاملات الكنترول لـ *Ent. durans* أو *L. acidophilus* (بدون بذور) بينما كانت أقل نسبة انخفاض وأعلى حيوية هي 96.77% للمعاملة *Ent. durans* مع 1.5% سيلليوم.

الجزء الثالث: تطوير وتقييم جودة مشروب لبنى حيوى متخمّر بواسطة الـ *Enterococcus durans* والمدعم بذور البريلا أو السيلليوم: تقييم الخصائص الفيزيوكيميائية ومضادات الأكسدة وحيوية البكتريا الداعمة للحيوية والتقييم الحسى للمنتج خلال التخزين

تم تطوير مشروب لبنى متخمّر مدعم حيويًا باستخدام *Enterococcus durans*، وببذور البريلا والسيلليوم ودراسة تأثيرات إضافة بذور البريلا والسيلليوم على بعض الخصائص الفيزيوكيميائية الكلية ونشاط مضادات الأكسدة والقدرة على الاحتفاظ بالماء وفصل الشرش وحيوية البكتريا المدعمة الحيوية *Enterococcus durans* والتقييم الحسى للمشروب اللبنى المتخمّر أثناء التخزين البارد لمدة 14 يومًا.

تم تحضير أربعة مشروبات لبنية مدعمة حيويًا تحتوي على 0% بذور (الكنترول)، 1% بريلا، 1% سيلليوم، 0.5% بريلا + 0.5% بذور سيلليوم، وتقييم جودتها خلال التخزين المبرد عند 0، 7، 14 يومًا.

وأشارت النتائج إلى زيادة إجمالي محتوى المواد الصلبة والدهون والبروتين والرماد والألياف في المشروب اللبنى المتخمّر الحيوى والمحتوية على البذور مقارنة بعينة المقارنة. وكانت القدرة على الاحتفاظ بالماء في المنتج الذي يحتوي على 1% من بذور السيلليوم أو التي تجمع بين السيلليوم وبذور البريلا أعلى من تلك الموجودة في عينة المقارنة، ولم يحدث فصل للشرش خلال فترات التخزين. وأظهرت العينات التي تحتوي على 1% من بذور البريلا نشاطًا مضادًا للأكسدة بنسبة 60% أعلى من عينة المقارنة. وظلت أعداد *Enterococcus durans* أعلى من 10^7 CFU/ml حتى نهاية فترة التخزين في جميع المعاملات المدعمة بالبذور وكانت العينة التي تحتوي على بذور البريلا هي الأفضل من حيث حيوية *Enterococcus durans*.

وفي المجمع، تم تطوير مشروب لبنى بروبيوتيك جديدًا متخمّر بـ *Enterococcus durans* ومدعم بـ 1% من بذور السيلليوم أو البريلا، لتحسين الخصائص الفيزيوكيميائية ونشاط مضادات الأكسدة، وحيوية البروبيوتيك، والخصائص الحسية في مشروب اللبن المتخمّر الحيوى.

الملخص العربي -----