جامعة الفيوم

كلية الزراعه

دراسات بيوتكنولوجية علي الجبن الراس الحيوي المنتج بإستخدام الترشيح الفائق

رسالة مقدمة من

ورده مصطفي عبد التواب عبيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية " البان " كلية الزراعة – فرع الفيوم– جامعة القاهرة ٢٠٠١

ماجستير في العلوم الزراعية "البان" كلية الزراعة– جامعة الفيوم ٢٠٠٨

كجزء من متطلبات الحصول علي

درجة دكتوراة الفلسفه في العلوم الزراعية (البان)

قسم الألبان

كلية الزراعة– جامعة الفيوم

٢٠١٦

دراسات بيوتكنولوجية علي الجبن الراس الحيوي المنتج بإستخدام الترشيح الفائق

رساله مقدمه من

ورده مصطفي عبد التواب عبيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية " البان " كلية الزراعة – فرع الفيوم– جامعة القاهرة ٢٠٠١

ماجستير في العلوم الزراعية "البان" كلية الزراعه– جامعة الفيوم ٢٠٠٨

للحصول علي

درجة دكتوراة الفلسفه

في

العلوم الزراعية "البان"

قسم الالبان – كلية الزراعة

جامعة الفيوم

لجنة الأشراف :

١–الأستاذ الدكتور/ محمود عبد الحليم دغيدي
أستاذ الالبان– كلية الزراعة –

٢–الأستاذ الدكتور/ وداد عزب متري
أستاذ ورئيس قسم الالبان– كلية الزراعة –

دراسات بيوتكنولوجية علي الجبن الراس الحيوي المنتج بإستخدام الترشيح الفائق

رساله مقدمه من

ورده مصطفي عبد التواب عبيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية " البان " كلية الزراعة – فرع الفيوم– جامعة القاهرة ٢٠٠١

ماجستير في العلوم الزراعية "البان" كلية الزراعة– جامعة الفيوم ٢٠٠٨

للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفه

في العلوم الزراعية "البان"

لجنة الحكم والمناقشة :

١– الأستاذ الدكتور/ محمد نجيب علي حسن كلية الزراعة – جامعة القاهرة	**أستاذ الألبان المتفرغ–**
٢–الأستاذ الدكتور/ جمال احمد ابراهيم وهاب الألبان المتفرغ– المركز القومي للبحوث	**أستاذ ميكروبيولوجيا**
٣– الأستاذ الدكتور/ وداد عزب متري الألبان– كلية الزراعة – جامعة الفيوم (مشرفا)	**أستاذ ورئيس قسم**
٤– الأستاذ الدكتور/ محمود عبد الحليم دغيدي كلية الزراعة – جامعة الفيوم (مشرفا رئيسيا)	**أستاذ الألبان–**

التاريخ: /

الملخص العربي

دراسات بيوتكنولوجية علي الجبن الراس الحيوي المنتج بإستخدام الترشيح الفائق

هناك إتجاه عالمي حديث لانتاج منتجات لبنيه لها فوائد صحيه و علاجيه بالاضافة الي الفائدة الغذائية، يعتبر الجبن الراس من اهم اصناف الجبن الجافة التي تنتشر في دول البحر المتوسط والشرق الأوسط وخاصة في مصر فهي من الجبن الرئيسيه والتي يمكن تصنيعها باستخدام تكنولوجيا الترشيح الفائق والتي انتشر إستخدامها في صناعة الجبن وذلك للعديد من الاسباب واهمها زيادة القيمه الغذائية والتصافي مما يزيد من العائد الاقتصادي عند تصنيع هذا الجبن. إستخدام بكتريا المدعمات الحيوية في تصنيع الجبن الراس يؤدي الي تعظيم الخواص الصحية لها وكذلك زيادة محتواها من حمض اللينوليك المزدوج (يحتوي علي رابطتين زوجيتين في صوره متبادله)،و الذي حظي باهتمام كبير في الأونه الأخيره وذلك لفوائده الصحيه والتي تتمثل في عمله كمضاد للسرطان، علاج امراض تصلب الشرايين، تخفيض الدهون بالجسم وتحسين النظام المناعي بالجسم. وتعتبر المنتجات اللبنيه وخاصة الجبن من أهم مصادر هذا الحامض الدهني.

ومن ناحية أخري يسعي الباحثون في مجال تصنيع الجبن الجاف الي تحسين جودتها والحد من نمو الميكروبات الملوثة لها اثناء فترة التسويه والتي تسبب العديد من المشاكل وزيادة الفاقد من الجبن خلال هذه الخطوة الهامه والحساسه عند التصنيع، وتستخدم حاليا بعض الاساليب الحديثه التي تواكب الاهتمام العالمي ومنها تطبيقات النانو تكنولوجي في مجال تصنيع الجبن واستخدام الأغطية الغذائية Edible coating والجسيمات متناهية الصغر (في مجال النانومتر وهو ١٠ ^{٩}من المتر) كمادة طبيعية آمنة مضادة للميكروبات فهي تعمل علي إطالة مدة حفظ الجبن من خلال حمايتها من مصادر التلوث المختلفة وتقليل معدل الفساد، وكذلك تعمل هذه الأغطيه علي تحسين جودة الجبن الناتج من خلال خواصها التي تحمي السطح من فقد الرطوبة والجفاف وبالتالي خفض الفقد في وزن الجبن. ولذلك فإن **اهداف هذه الدراسة هي**

- دراسة تأثير استخدام بعض بادئات المدعمات الحيوية وكذلك فترة التسوية علي انتاج جبن راس مرتفع في محتواه من حمض اللينوليك المزدوج ودراسة خواص الجبن الميكروبيولوجية والكيميائية والحسية خلال فترة التسويه.
- تحضير نانوشيتوزان من الشيتوزان ودراسة بعض خواصة وكذلك تأثيرة علي بعض البكتريا الممرضه وميكروبات الفساد الملوثة للجبن الراس وتقدير اقل تركيز مثبط واقل تركيز قاتل كذلك حجم المنطقة الرائقة بطريقة الانتشار عبر الجيل.
- تاثير إستخدام نانوشيتوزان مع بعض الاغطيه الغذائية مثل التغطيه بالشيتوزان أو بروتين الشرش علي بعض الخواص الكيميائيه والميكروبيولوجيه و الحسيه للجبن الراس الناتج خلال فترة التسويه (٩٠ يوم) وتاثيره علي نمو الفطريات الملوثة لسطح الجبن.

<u>ولتحقيق تلك الأهداف فقد تمت الدراسة من خلال ثلاث أجزاء كما يلي :</u>

الجزء الأول: تأثير إستخدام بعض بادئات المدعمات الحيويه علي زيادة محتوي حمض اللينوليك المزدوج بالجبن الراس المصنع بالترشيح الفائق خلال فترة التسويه

في هذا الجزء تم إستخدم اللبن البقري المركز بالترشيح الفائق بمعامل تركيز ٢ ١٢٠ كيلو لبن ركزت الي ٦٠كيلو مركز) في تصنيع الجبن الراس، وقد تم تقسيم المركز إلي أربعة معاملات كما يلي:

١. المعامله الاولي كنترول (C): اللبن البقري المركز+ زيت سمسم ٠.٢ % معامل بانزيم الليبيز+١% بادئ الزبادي يتكون من:
(Lb. delbreukii subs*p bulgaricus* and *Str. thermophilus*, ١:١).

٢. المعامله الثانية (PL): اللبن البقري المركز+ زيت سمسم ٠.٢ % معامل بانزيم الليبيز+١% بادئ يتكون من : ١:١ (*Lb. plantarum* and *Str. thermophilus*,

٣. المعامله الثالثة (RH): اللبن البقري المركز+ زيت سمسم ٠.٢ % معامل بانزيم الليبيز+١% بادئ يتكون من: ١:١ (*Lb. rhamnoses* and *Str. thermophilus*,

٤. المعامله الرابعة (PA): اللبن البقري المركز+ زيت سمسم ٠.٢ % معامل بانزيم الليبيز+١% بادئ يتكون من: (*Lb. paracasei* and *Str. thermophilus*, ١:١)

ثم تسوية الجبن الناتج لمدة ٩٠ يوم علي درجة حراره ١٢± ٢ °م ورطوبه نسبيه ٨٥– ٩٠% تم خلالها إجراء الفحص الميكروبيولوجي (العدد الكلي للميكروبات الحية والـ lactobacilli والـ Streptococci وتم اختبار للكشف عن وجود مجموعة الكوليفورمو الخمائر و الفطريات والـ *Staph. aureas*) و الكيميائي (الحموضه، قيم الـ pH، النيتروجين الكلي، النيتروجين الذائب في الماء، التحلل البروتيني باستخدام الهجره الكهربيه عبر الجيل، الدهن، الرطوبه، الملح، الاحماض الدهنية) و ايضا التقييم الحسي للجبن الناتج خلال فترة التسويه علي فترات مختلفة.

فيما يلي ملخص لأهم النتائج المتحصل عليها في هذا الجزء بعد تحليلها إحصائياً:

١. حدث زيادة في أعداد الـ lactobacilli الحيه في عينات الجبن الراس الحيوي حتي ٦٠ يوم من التسويه ثم بدأ بعد ذلك في الانخفاض في جميع المعاملات للجبن الناتج وكانت المعامله الأعلي في اعداد كلا من الـ lactobacilli و الـ Streptococci والعد الكلي هي (RH) *Lb. rhamnoses* بينما الكنترول سجلت أقل الأعداد.

٢. عند الكشف عن الميكروبات المرضية وكذلك الملوثه للجبن الراس مثل مجموعة الكوليفورم و الـ *Staph. aureas* والخمائر والفطر لم تظهر ايا منها سواء في عينات الجبن الراس الطازجه (قبل التسوية) أو اثناء التسويه حتي نهايتها(٩٠ يوم).

٣. ايضا وجد ان الـ % للحموضه في عينات الجبن الراس الناتج تزداد تدريجيا مع التقدم في فترة التسويه حتي نهايتها وذلك علي العكس من قيم الـ pH إنخفضت تدريجيا خلال فترة التسويه وسجلت عينة الجبن الراس المصنع باستخدام سلالة *Lb. paracasei* (PA) اقل قيم pH بينما عينات الـ PL والكنترول سجلت اعلي قيم pH.

٤. سجلت الرطوبه إنخفاضا تدريجيا بنسب متفاوته مع التقدم في فترات التسويه وعلي العكس من ذلك حدث ارتفاع تدريجي في كل من الـ % للدهن والملح والنتروجين الكليخلال فتر ات التسويه المختلفة.

٥. وجد أن الـ % النيتروجين الذائب في الماء منسوبا للنيتروجين الكلي كان منخفضا في بداية التسويه ثم ارتفع بعد ذلك تدريجيا حتي نهاية التسويه وكان الجبن المصنع باستخدام سلالة *Lb*

paracasei (PA) الاعلي في الـ %النيتروجين الذائب بالمقارنه مع عينات الجبن الناتجه من المعاملات الاخري.

٦. اوضحت نتائج تحلل البروتين باستخدام الهجره الكهربيه عبر الجيل لعينات الجبن الطازجه وكذلك في نهاية فترة التسوية (٩٠ يوم) زيادة كثافة شقوق الكازين الناتجه عن التحلل البروتيني للجبن وكذلك ظهور شقوق جديده ناتجه عن التحلل البروتيني في المعاملات المختلفه في نهاية التسويه وخاصة في عينات الجبن الراس الحيوي بالمقارنه بعينة الكنترول حيث كانت شقوق البروتين الاقل كثافه.

٧. هناك إختلاف بين المعاملات في محتواها من الأحماض الدهنيه خاصة محتواها من حمض اللينوليك المزدوج وقد سجلت عينة الجبن الطازج الناتج من المعامله (PL) اعلي قيمة بالمقارنه بالكنترول التي سجلت اقل قيمة، بينما احتوت المعاملة PA اعلي قيمة و المعامله PL سجلت اقل قيمة من حمض اللينوليك المزدوج في نهاية فترة التسويه.

٨. حصلت عينة الجبن الراس المصنع بإستخدام بادئات المدعمات الحيوية علي أعلي درجات تقييم حسي بالمقارنة بالكنترول، حيث كانت كلا من معاملات الجبن الراس (PL) و (PA) هي الاعلي في التقييم الحسي بالمقارنه بالكنترول (C)، المعاملة (RH) سجلت درجات اقل مقارنة بباقي المعاملات وكانت الفروق غير معنوية.

الجزء الثاني: تحضير ودراسة خواص نانوشيتوزان وتأثيرة المضاد علي بعض الميكروبات الممرضة والملوثة للجبن الراس

تم في هذا الجزء تحضير نانوشيتوزان اعتمادا علي الارتباط الايوني بين الشحنات الموجبه للشيتوزان والشحنات السالبه للصوديوم الخماسي عديد الفوسفات ودراسة بعض خواصة مثل الشكل المورفولوجي للنانوشيتوزان المحضر باستخدام الميكروسكوب الالكتروني النافذ وتقدير حجم جسيماته باستخدام

Dynamic light scattering وكذلك جهد زيتا بإستخدام نفس الجهاز، كذلك تم تقدير التأثير المضاد للميكروبات لكلا من الشيتوزان ونانوشيتوزان علي بعض سلالات الميكروبات المرضية والملوثه للجبن.

وهي *Sal. enteritidis, L. monocytogenes, E. coli, B. cereus* و *Staph. aureus* وكذلك سلالتين من الخمائر وهي *Saccharomyces cervices* and *Candida albicans* كما تم دراسة تأثيرة علي فطر *Pencillium reqfortii* وتقدير اقل تركيز مثبط واقل تركيز مميت وكذلك باستخدام الانتشار عبر الجيل وقياس المنطقه الرائقه حول الماده المستخدمه كمؤشر للتاثير المثبط للشيتوزان ونانوشيتوزان.

أهم النتائج المتحصل عليها في هذا الجزء كالتالي:

١. توزيع جسيمات النانوشيتوزان كان في مدي ضيق (polydispersity index, PDI =٠.٤١٧) ومتوسط حجم الجسيمات حوالي ٩٣.٧٦ نانومتر وجهد زيتا ١٤.٦ مللي فولت.

٢. وجد ان النانوشيتوزان هو الأعلي في التاثير المضاد للميكروبات المختبرة بالمقارنه بالشيتوزان وذلك من خلال قياس المنطقه الرائقه حول الماده فقد اعطي نانوشيتوزان منطقه رائقه اكبر مع *L. monocytogenes* بينما كانت الاقل مع *Sal. enteritidis* و *E. coli*، بينما مع الشيتوزان كانت أعلي منطقة رائقة مع *L. monocytogenes* و الاقل مع *Staph. aureus*

٣. دلت نتائج تقدير اقل تركيز مثبط واقل تركيز مميت ان النانوشيتوزان أكثر تثبيطا لبكتريا الـ *Staph. aureus* وكان اقل تثبيطا لبكتريا *Sal. enteritidis* ، أما الشيتوزان فكان الاكثر حساسيه له كلا من *Sal. enteritidis* و *L. monocytogenes* .

٤. كان الشيتوزان اقل تاثير ا علي *C. albicans* بالمقارنه بالنانوشيتوزان ومن ناحيه اخري كان الـ *Saccharomyces servicea* الاكثر حساسيه للنانوشيتوزان بالمقارنه بجميع الميكروبات المختبره.

٥. نانوشيتوزان كان له تاثير مثبط علي الفطر المختبر *Pencillium reqfortii* فقد كان له تاثير واضح علي نمو الفطر وخاصة عند تركيز ٣ و ٤.٥ جم/لتر حيث وصلت نسبة التثبيط الي ٩٠ و ١٠٠ %علي التوالي بينما كان الشيتوزان تاثير ه ضعيف علي هذا الفطر.

الجزء الثالث: تأثير بعض الاغطية الغذائية Edible coating المحتويه علي نانوشيتوزان علي جودة الجبن الراس المصنع بالترشيح الفائق خلال مدة التسويه

تمت هذه الدراسة علي افضل المعاملات المتحصل عليها في الجزء الأول من هذه الدراسة لتصنيع الجبن الراس المحتوي علي بادئات المدعمات الحيويه وهي باستخدام بادئ مكون من (*Lb. paracasei* and *Str. thermophilus*, ١:١)
مع اختلاف التغطية كما بالمعاملات التالية:

- المعامله الاولي: تغطية الجبن الراس بالشمع (C) كنترول
- المعامله الثانيه : تم تغطية الجبن الراس بالشمع مع١% حمض لاكتيك (CL)
- المعامله الثالثه: تم تغطية الجبن الراس ببروتين الشرش (W)
- المعامله الرابعه: تم تغطية الجبن الراس ببروتين الشرش المضاف له نانوشيتوزان (WN)
- المعامله الخامسه: تم تغطية الجبن الراس بالشيتوزان (CH)
- المعامله السادسه: تم تغطية الجبن الراس بالشيتوزان مضاف له نانوشيتوزان(CHN)

وتم تصنيع قرصين جبن من كل معاملة أحدهما تم تلويث سطحه بجراثيم فطر *Pencillium reqfortii* والقرص الاخر كما هو دون اي اضافة(لذلك اشتمل هذا الجزء علي ١٢ قرص). تم تسوية الجبن الناتج لمدة ٩٠ يوم علي درجة حراره ١٢±٢ °م ورطوبه نسبيه ٨٥– ٩٠%، وخلال فترة التسويه إجريت بعض التحليلات الكيميائية (% الحموضه، قيم الـ pH، النيتروجين الكلي، النيتروجين الذائب في الماء، التحلل البروتيني بإستخدام الهجره الكهربيه عبر الجيل، الدهن، الرطوبه، الملح، الاحماض الدهنية الطيارة) وكذلك تم الفحص الميكروبيولوجي لبعض المجموعات الميكروبية مثل (عد مجموعة Lactobacilli ومجموعة Streptococci والعد الكلي للميكروبات الحية والخمائر و الفطريات و مجموعة الكوليفورم و الـ *Staph. aureas*)وكذلك تم التقييم الحسي لعينات الجبن عند اعمار مختلفة من التسوية (طازج، ٣٠، ٦٠، ٩٠ يوم).

وقد اوضحت النتائج المتحصل عليها في هذا الجزء بعد تحليلها احصائيا ما يلي:

١. حدث زياده تدريجيه في الاعداد الحيه لمجموعة الـ Lactobacilli حتي عمر ١٥ يوم من تسوية الجبن تبعها نقص تدريجي في الاعداد الحية حتي نهاية التسوية. وقد سجلت المعاملة WN اعلي اعداد بينما الكنترول كانت اقل المعاملات،و عند عد البكتريا الحيه لمجموعة الـ Streptococci وجد ان المعاملات التي تمت عليها التغطيه ببروتين الشرش مع نانوشيتوزان كانت الاعلي اعدادا بالمقارنه بباقي المعاملات

الشرش اقل الاعداد، وحدث نقص تدريجي في الاعداد الحية خلال فترة التسوية في جميع المعاملات.

٢. العدد الكلي للميكروبات الحيه زادت زيادة غير معنوية حتي عمر ١٥ يوم ثم حدث نقص تدريجيا في الاعداد حتي نهاية فترة التسوية وكانت الفروق ضئيله ما بين المعاملات وبعضها حيث كانت WN اعلي المعاملات بينما سجلت الكنترول اقل الاعداد مقارنة بباقي المعاملات.

٣. لم تظهر الخمائر او الفطريات في معاملات الجبن الراس التي لم تلوث بالفطر، اما عن تلك الاقراص التي لوثت بالفطر بدأ ظهور الفطريات مع بداية الشهر الاول من التسويه وازداد عدد الفطريات والخمائر في عينات المعاملات (C, CL) مع التقدم في فترة التسويه حتي نهايتها ، اما عن الجبن المغطي بالشيتوزان او بروتين الشرش فحدث تثبيط نسبي للفطر بالمقارنه بالكنترول اما الجبن الناتج بالمعاملات المضاف لها جسيمات شيتوزان في حجم النانو فحدث تثبيط كامل للفطريات لم تظهر عند عمر شهر من التسويه وحتي نهاية فترة التسويه (٩٠ يوم).

٤. عند تقدير الـ % الحموضه وقيم الـ pH في عينات الجبن الراس وجد ان هناك زياده تدريجيه في الـ % الحموضه خلال فترات التسوية يقابلها انخفاض في قيم الـ pH، وسجلت معاملات الجبن الراس المغطاة بالشيتوزان وبروتين الشرش المضاف له نانوشيتوزان اعلي قيم لل %حموضه مقارنة بالمعاملات الاخري في حين التغطيه بالشيتوزان فقط و الكنترول كانت الاقل في نسبة حموضه.

٥. إنخفض المحتوي الرطوبي للجبن الراس مع التقدم في فترة التسوية، بينما حدث زيادة في كل من الـ % للدهن و% الملح في عينات الجبن الراس مع التقدم في عملية التسويه ولكن الاختلافات بين المعاملات كانت غير معنويه.

٦. حدث زياده تدريجيه لنسبة النيتروجين الذائب في الماء / النيتروجين الكلي خلال فترات التسوية المختلفة و كانت اعلي المعاملات الجبن الراس المغطي ببروتين الشرش مع نانوشيتوزان، واظهرت نتائج التحلل البروتيني للجبن باستخدام الهجرة الكهربية عبر الجيل ان الفروق بين المعاملات كانت غير محسوسه ولكنها أظهرت اختلافات بين فترات التسويه وذلك بظهور شقوق جديدة بعد ٩٠ يوم من التسوية والتي لم تظهر في العينات الطازجة

٧. ومن مؤشرات التسويه أيضا الاحماض الدهنية المتطايرة الكلية والتي سجلت زيادة تدريجية خلال فترة التسوية وسجلت أعلي القيم مع المعاملات المغطاة ببروتين الشرش ونانوشيتوزان تلاها الشيتوزان المضاف له نانوشيتوزان وذلك بالمقارنة بباقي المعاملات والتي لم يظهر بها فروق معنوية.

٨. عند عمل تقييم حسي لعينات لجبن الراس المغطي بالشيتوزان أو بروتين الشرش وحدها أو المضاف لها نانوشيتوزان (WN ، CHN) بالمقارنه بالكنترول خلال مدة التسويه وجد ان الكنترول كانت اقل نسبيا عن باقي المعاملات ولكن الفروق غير معنويه، كذلك لوحظ بداية التغير في الطعم والقوام والتركيب بعد مرور شهر من التسويه وازدادت مع التقدم في فترة التسويه حتي نهايتها.

٩. عند فحص المظهر للجبن الراس الملوث بالفطر خلال فتر ات التسويه لمعرفة تاثير الاغطية المختلفه علي نشاطه وجد ان عينات المعاملات C, CL والتي تم تغليفها بالشمع بدأ ظهور الفطر عند عمر شهر من التسويه وأزداد مع التقدم في فترات التسويه وظهر بصوره اقل علي الجبن الراس المغطي بالشيتوزان وبروتين الشرش اما معاملات نانوشيتوزان فلم يظهر بها الفطر حتي نهاية فترة التسويه (٩٠ يوم).

بناء علي النتائج السابقة يمكن التوصية بما يلي:

١. إستخدام بادئ *Lb. paracasei* عند تصنيع الجبن الراس لاعطاء خصائص جيدة للجبن وكذلك محتوي عالي من حمض اللينوليك المزدوج والذي يتميز بخواصة الصحية، وكذلك إستخدام بادئ *Lb. plantarum* في صناعة المنتجات اللبنية التي تستهلك طازجة.

٢. إستخدام الاغطية الغذائية مثل السكرات العديدة منها الشيتوزان والبروتينات خاصة بروتين الشرش في تغطية الجبن

التوسع في استخدام تطبيقات النانوتكنولوجي في مجال الصناعات اللبنية عامة وفي مجال تغطية الجبن الجافة والنصف جافة بصفة خاصة مثل استخدام نانوشيتوزان مع الاغطية لانها تعمل كمضادات طبيعية للميكروبات الملوثة