"دراسة حركية البكتيريا اللبنية أثناء التخمر اللبني للبن المدعم بالسبيرولينا (Spirulina)"،

كاتيا الياس [1] عبد الوهاب مرعي[2] شريف صادق [2]

الملخص:

تمّ في هذا البحث دراسة تأثير إضافة السبيرولينا في حركية البكتيريا اللبنية أثناء التخمر اللبني من خلال تحديد أعداد البكتيريا اللبنية العصوية والكروية ،قيم الـpH، الحموضة والقدرة المضادة للأكسدة.

أجريت تجارب التخمر اللبني على الحليب البقري كتجربة شاهد وعينات الحليب المضاف إليه سبيرولينا بنسب%(0.7-0.5-0.3) عند الدرجة 45°C وبإضافة البادئ اللبني بنسبة 3%، تمّ تتبع النمو البكتيري للنوعين خلال الأزمنة min(180-120-90-60-0) من بدء التخمر. بعد انتهاء التخمر اللبني عند قيمة pH 4.6 وُضعت العينات في الحاضنة عند الدرجة 37°C مدة 24ساعة بهدف استمرار التخمر ببطء، من ثمّ حُددت أعداد البكتيريا اللبنية ،قيم الـpH، الحموضة والقدرة المضادة للأكسدة. تبين من النتائج أن إضافة السبيرولينا حفزت النمو البكتيري، خفضت قيم الـpH ، زادت النسبة المئوية للحموضة0.35% والقدرة المضادة للأكسدة 37.11%، كما أظهرت عينات اللبن المدعم بنسبة 0.3% سبيرولينا أعلى معدل نمو للبكتيريا اللبنية العصوية *Lactobacillus bulgaricus* ، و بنسبة 0.7% سبيرولينا النمو الأعلى للبكتيريا اللبنية الكروية *Streptococcus thermophilus* حيث بلغت أعدادها $4*10^4$,$4.5*10^4$على التوالي بعد 180min من بدء التخمر .

الكلمات المفتاحية: السبيرولينا ،التخمر اللبنى ، البكتيريا اللبنية.

[1] طالبة دكتوراه في قسم الهندسة الغذائية-كلية الهندسة الكيميائية والبترولية-جامعة حمص

[2] أستاذ في فسم علوم الأغذية- كلية الزراعة-جامعة دمشق.

[3] أستاذ في قسم الهندسة الغذائية-كلية الهندسة الكيميائية والبترولية-جامعة حمص.

Study of the kinetics of lactic acid bacteria during lactic fermentation of spirulina-fortified yogurt.

Katia Elias(1) Abdul Wahab Marei(2) Sharif Sadik(2

Abstract

:In this study, the effect of spirulina supplementation on the growth kinetics of lactic acid bacteria during lactic fermentation was investigated by determining the counts of rod-shaped and coccoid lactic acid bacteria, pH values, titratable acidity, and antioxidant capacity.Lactic fermentation experiments were carried out using cow's milk as a control sample and milk samples supplemented with spirulina at concentrations of 0.3, 0.5, and 0.7%. Fermentation was conducted at 45 °C with the addition of a lactic starter culture at a level of 3%. The growth of both bacterial groups was monitored at fermentation times of 0, 60, 90, 120, and 180 min from the onset of fermentation.After completion of lactic fermentation at pH 4.6, the samples were incubated at 37 °C for 24 h to allow slow continuation of fermentation. Subsequently, lactic acid bacteria counts, pH values, titratable acidity, and antioxidant capacity were determined.The results indicated that spirulina addition stimulated bacterial growth, decreased pH values, increased titratable acidity to 0.35%, and enhanced antioxidant capacity by 37.11%. Moreover, yogurt samples fortified with 0.3% spirulina exhibited the highest growth rate of rod-shaped lactic acid bacteria (Lactobacillus bulgaricus), whereas samples supplemented with 0.7% spirulina showed the highest growth of coccoid lactic acid bacteria (Streptococcus thermophilus), with counts reaching 4×10^4 and 4.5×10^4 , respectively, after 180 min from the start of fermentation.

Keywords: Lactic Fermentation, Spirulina ,Lactic acid bacteria

(1) PhD student at Food Engineering Department- Faculty of Chemical and Petroleum Engineering-Homs University

(2) Professor at Food Science Department- Faculty of Agriculture- Damascus University

(3) Professor at Food Engineering Department- Faculty of Chemical and Petroleum Engineering-Homs University

أولاً : المقدمة و الدراسة المرجعية:

التخمر اللبني يعد من أقدم الوسائل البيولوجية المستخدمة في حفظ وتحسين جودة الألبان، ويتم بواسطة البكتيريا اللبنية (Lactic Acid Bacteria – LAB) مثل *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* و*Streptococcus thermophilus*. في السنوات الأخيرة، ازداد الاهتمام بتدعيم اللبن بمنتجات طبيعية غنية بالعناصر الغذائية مثل طحالب السبيرولينا (*Spirulina platensis*)، لما تحتويه من بروتينات عالية الجودة، حموض أمينية، فيتامينات ومعادن. ويهدف هذا التدعيم إلى رفع القيمة التغذوية والوظيفية للبن المتخمر، مما قد يؤثر بدوره على حركية ونمو البكتيريا اللبنية خلال عملية التخمر (Dinçoğlu et al., 2024)

تركيب السبيرولينا ودورها في دعم النمو البكتيري:

تحتوي السبيرولينا على أكثر من60% بروتين، بالإضافة إلى فيتامين B_{12}، الحديد، البيتا كاروتين، وحموض دهنية غير مشبعة، ما يجعلها وسطاً غذائياً محفزاً للبكتيريا اللبنية أثناء التخمر. وجود هذه المركبات يسهم في تعزيز النشاط الميكروبي وتحسين معدل النمو، خاصة في المراحل المبكرة من التخمر. كذلك، تشير بعض الدراسات إلى أن وجود السكريات متعددة الوظائف في السبيرولينا قد يوفر مصدر كربون إضافي للبكتيريا اللبنية (Colla et al.,2017).

شهدت السنوات الأخيرة اهتمامًا متزايدًا باستخدام الطحالب الدقيقة مثل السبيرولينا في الصناعات الغذائية، ولا سيما في منتجات الألبان المخمرة، نظرًا لقيمتها الغذائية العالية وتأثيرها الوظيفي المحتمل على الكائنات الدقيقة النافعة.

في هذا السياق، قام (Dinçoğlu et al., 2024) بدراسة تأثير إضافة *Spirulina platensis* على الخصائص الميكروبيولوجية والحسية للبن المخمر، ووجدوا أن تدعيم اللبن بنسبة 1% من السبيرولينا أدى إلى زيادة ملحوظة في نمو البكتيريا اللبنية، خصوصًا خلال المراحل المبكرة من التخمر، كما حسّن من استقرارها أثناء التخزين.

وفي دراسة مشابهة، وجد (Guldas & Irkin, 2022) أن وجود السبيرولينا في تركيبة اللبن المتخمر ساهم في تسريع عملية انخفاض درجة الحموضة pH، ما يدل على تنشيط التمثيل الغذائي للبكتيريا اللبنية، وهو ما أرجعوه إلى احتواء السبيرولينا على مركبات نيتروجينية وأحماض أمينية سهلة الامتصاص.

من جانب آخر، قام (Batista et al., 2019) بتقييم تأثير الطحالب الدقيقة كمكونات وظيفية في منتجات الحليب المتخمر، ولاحظوا أن إضافة السبيرولينا حسّنت من بقاء البادئات الحية،

أضاف(Luwidharto et al., 2022) مسحوق السبيرولينا المجفف إلى الحليب قبل عملية التخمر بنسب عدة ضمن %(0.1–0.5) وجد أن الإضافة 0.3% كانت الأنسب لأنها حسنت نمو البكتيريا اللبنية *Lactobacillus plantarum* Dad 131 و *Streptococcus thermophilus* Dad 11 وزادت إنتاج الحمض والنشاط المضاد للأكسدة دون أن تؤثر سلباً على القوام أو الطعم بشكل ملحوظ مقارنة بالتراكيز الأعلى ،حيث وصل عدد البكتيريا اللبنية و البريبيوتيك (8.73–9.19logCFU/ml و 8.92logCFU/ml بعد 24ساعة ،بلغت الحموضة المعايرة 1.08% وانخفضت قيمة الـpH إلى 4.4 كما ازدادت اللزوجة بعد12 ساعة من التخمر.

درس (De caire et al.,2000) التأثير التحفيزي للمعلّقات المائية من الكتلة الحيوية الجافة لطحلب *Spirulina platensis* المستخلصة عند درجتي حموضة 6.8و5.5، على نمو أربع سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك المزروعة في الحليب فأظهرت النتائج أن إضافة 6mg/ml من الكتلة الجافة لـ*Spirulina platensis* إلى الحليب حفّزت نمو بكتيريا *Lactococcus lactis* بنسبة 27% كما زاد نمو السلالات الأخرى أيضًا، وإن بدرجات متفاوتة.

أشار (Rose et al.,2023) إلى الكفاءة البروبيوتيكية للسبيرولينا التي عززت قدرة بكتيريا حمض اللبن على البقاء والتخمر بشكل أفضل وذلك لاحتوائها على مكونات محفزة للنمو مثل الأدنين والحموض الأمينية الحرة وحمض اللينوليك حيث قارن (Rose et al.,2023) عملية التخمر للبن الرائب المطور بتراكيز مختلفة من السبيرولينا %(1–0.5–0.25) مع عينة الشاهد (لبن رائب دون سبيرولينا). أظهرت النتائج أن تدعيم اللبن بنسبة 0.25% سبيرولينا أدى إلى تحسين الخصائص الغذائية والوظيفية من خلال زيادة النشاط المضاد للأكسدة، كما أثرت بشكل كبير على تعداد *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* في العينات المعالجة مقارنة بعينة الشاهد خلال 12يوماً من التخزين البارد عند الدرجة 4°c حيث بلغ التعداد الابتدائي للبكتيريا 9.13Log cfu/g و 9.12على التوالي بعد عملية التخمر

ثانياً : هدف البحث :

هدف البحث إلى:

1-دراسة تأثير إضافة السبيرولينا على معدل نمو البكتيريا اللبنية بنوعيها العصوية والكروية خلال الساعات الثلاث الأولى من التخمر.

2-تحديد التغيرات في رقم الحموضة pH، الحموضة الكلية ومضادات الأكسدة بعد 24ساعة من التخمر اللبني.

3-تحديد أعداد البكتيريا اللبنية في اللبن المدعم مقابل اللبن العادي في نهاية التخمر.

ثالثاً: المواد وطرائق البحث:

3-1-المواد المستخدمة:

لإنجاز هذا البحث استخدمت المواد التالية :

1- سبيرولينا (Spirulina platensis) إنتاج شركة Dxn الماليزية، مجفف بالتجميد (Freeze-dried) بنسبة نقاء $\geq$ 95%، دفعة TSCC205004 :تم الحصول عليها بإكثار الإشتيات بمزارع خاصة في ماليزية (مستوردة).

2-حليب بقري طازج مبستر مضبوط الدسم (3.5%) إنتاج معمل ألبان حمص وذلك لضمان ثبات التركيب الكيميائي للحليب المستخدم في تحضير جميع العينات.

3--بادئ اللبن الرائب: هو بكتيريا حمض اللبن نقي (إنتاج شركة بيوتيك-إيطاليا) إنتاج مختبرات شركة أمنة-سوريا-حمص-مدينة حسياء الصناعية والمكون من بكتيريا Lactobacills bulgaricus , Streptococcus thermophiles بنسبة 1;1.

4-بيئات غذائية (أوساط زرع جرثومي media culture) إنتاج شركة merck الألمانية:

-المواد الكيميائية الضرورية لعملية تحليل العينات (ماءات الصوديوم -فينول فتالئين-ميتانول).

-التجهيزات الإضافية المستخدمة: موازين مخبرية دقيقة ،عبوات زجاجية، أطباق بتري ،ماصات.

3-2-الطرائق المستخدمة:

3-2-1-تجربة التخمر اللبني:

"تم إجراء التخمر اللبني على مرحلتين: في المرحلة الأولى، تم تحضين العينة عند درجة حرارة 45°C مدة3-4 ساعات بهدف تنشيط نمو البكتيريا اللبنية. في المرحلة الثانية، استمر التخمر عند درجة حرارة 37°C (لتجنب الإجهاد الحراري للبكتيريا وللمركبات الحيوية الموجودة في السبيرولينا) مدة 24 ساعة لإعطاء وقتاً للبكتيريا لاستغلال المغذيات الموجوة في السبيرولينا ولإنتاج حموض عضوية ومركبات نكهة أكثر تظهر بوضوح التأثير التحفيزي للسبيرولينا على النمو البكتيري."

خطوات العمل :

1-أُخذ 1000ml من الحليب البقري ووضع في حمام مائي مع مراقبة درجة حرارة الحليب حتى تصبح95°C، تُرك عند هذه الدرجة لمدة 5 دقائق من أجل عملية البسترة .

2- تم تقسيم الحليب لعدة عينات (كل عينة 100ml) وعند انخفاض درجة الحرارة إلى 45°Cتمت إضافة السبيرولينا بنسبة %(0-0.3-0.5-0.7) مع التحريك والمزج بشكل جيد حتى التأكد من ذوبان كامل الكمية.

3- أُضيف البادئ اللبني بنسبة 3% لكل عينة (بعد ذوبان السبيرولينا والتأكد من درجة حرارة الحليب 45°Cمع التحريك ببطء بعدها تم نقل محتوى البيشر إلى العبوات الزجاجية المعقمة مسبقاً و أغلقت بشكل جيد وسُميت العينات وفق الجدول (1) :

الجدول(1): تسمية عينات اللبن وفق نسب السبيرولينا .

رمز العينة	العينة
A	الشاهد: حليب متخمر(لبن)
B	حليب متخمر + 0.3% سبيرولينا
C	حليب متخمر + 0.5% سبيرولينا
D	حليب متخمر + 0.7% سبيرولينا

4-وُضعت العبوات في الحاضنة بدرجة حرارة 45°Cمدة 4-3ساعات مع مراقبة قيمة pH بشكل مستمر كل ساعة حتى pH=4.6 ، وكذلك تمت عملية التخثر مع مراقبة دائمة لدرجة حرارة الحاضنة(عطرة،2017) .

5- نُقلت العينات من الحاضنة لجو الغرفة الداخلي و تُركت حتى انخفضت درجة حرارتها لدرجة حرارة الغرفة.

3-2-2-الاختبارات الفيزيائية والكيميائية:

تم إجراء التجارب العملية والتحاليل المخبرية في مخابر قسم الهندسة الغذائية في جامعة حمص (ثلاث مكررات) وحُددت النتائج عن طريق الاختبارات والتجارب التالية:

- رقم الحموضة (pH): باستخدام مقياسpH meter(AOAC.,2019).
- الحموضة المعايرة: وفق طريقة المعايرة بمحلول 0.01N NaOH وحسابها كنسبة مئوية مقدرة على أساس حمض اللبن(AOAC.,2019).
- المقدرة المضادة للأكسدة وفق طريقة DPPH حسب ,.Yildrim et al). 2001)

3-2-3-الاختبارات الميكروبيولوجية:

يبين الجدول(2) الاختبارات الميكروبيواوجية التي تمّ إجروؤها.

جدول(2): الاختبارات الميكروبيواوجية التي تمّ إجراؤها.

الاختبار الميكروبيولوجي	الهدف	البيئة المناسبة
البكتيريا اللبنية الكروية *Streptococcus thermophile*	لتنمية وتعداد البكتيريا اللبنية الكروية	M17 Agar
البكتيريا اللبنية العصوية *Lactobacills bulgaricus*	لتنمية وتعداد البكتيريا اللبنية العصوية	MRS Agar(De Man-Rogosa and Sharpe

3-2-3-1-التحليل الميكروبيولوجي للبكتيريا اللبنية أثناء التخمر:

تم تتبع النمو البكتيري للبكتيريا اللبنية خلال عملية التخمر اللبني بإجراء اختبارات زرع جرثومي دوري على فترات زمنية منتظمة. حيث تم أخذ عينات من اللبن المخمر خلال الأزمنة min(180-120-90-60-0) من بداية التخمر وحتى pH=4.6، تمّ تكرار عملية الزرع للعينات بعد 24ساعة أيضاً وذلك لتقييم تأثير إضافة السبيرولينا على الكثافة العددية للبكتيريا اللبنية.

تمّ الزرع على وسط (MRS Agar و M17)، تليها الحضانة عند درجة حرارة (37°C) المناسبة لمدة 48ساعة ثم جرى حساب عدد المستعمرات البكتيرية (CFU/ml) بهدف مقارنة التغيرات في نمو البكتيريا بين العينات المعالجة بالسبيرولينا وتلك غير المعالجة (الشاهد).

طريقة العمل :

1- رُجت العينات السابقة حوالي 25 مرة ، تم العمل في شروط عقيمة وتمديد العينات بنسبة (1:100) وذلك بسحب 1ml من العينة إلى 99ml ماء معقم ، والرج جيداً للحصول على التخفيف المطلوب وبنفس الطريقة لباقي العينات .
2- أُخذ 1ml من المحلول الممدد (1:100) إلى الطبق الموافق وسُجل عليه مقدار التخفيف وحجم السائل المزروع .
3- قُلبت الأطباق بعد15min من التلقيح .
4- وُضعت الأطباق في الحاضنات عند الدرجة 37ºC خاصة بإكثار وتنمية البكتيريا.

5- تم حساب عدد الأحياء الدقيقة في المليليتر الواحد من الحليب وفق المعادلة التالية :

عدد المستعمرات النامية في الطبق الواحد ×حجم السائل المزروع ×مقلوب التركيز . [4]وذلك بعد 48 ساعة من أجل البكتيريا (صادق.،2006).

3-2-4-الاختبارات الحسية :

تعتبر الخواص الحسية للبن مهمة في قبول المستهلك للمنتج ، يؤثر لون اللبن الملمس ، المظهر ، النكهة وفصل المصل بشكل كبير على القبول العام للبن المتخمر .

وفقاً لذلك تم إجراء عملية تقييم حسي للعينات (اللون-الطعم-الرائحة-القبول العام) من قبل مجموعة من الأشخاص المتذوقين وفق (Suresh et al.,2021).

رابعاً: النتائج والمناقشة:

4-1-نتائج التحليل الميكروبيولوجي:

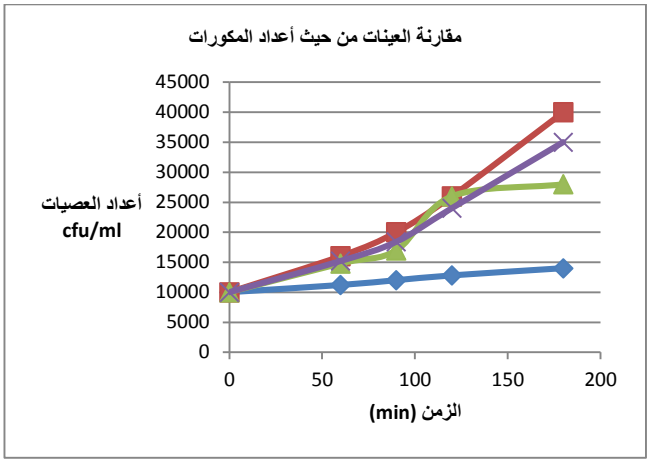
4-1-1-أثناء التخمر اللبني:

يظهر الجدول (4) تأثير إضافة السبيروواينا في أعداد البكتيريا اللبنة العصوية أثناء الساعات الثلاث الأولى من التخمر اللبني للعينات عند درجة حرارة 45°C بعد الزرع على وسط MRS Agar.

جدول (3): أعداد البكتيريا اللبنة العصوية في العينات خلال min (180-120-90-60-0).

الزمن(min)	العينات تبعاً لـ نسبة السبيرولينا المضافة (%)			
	A(0%)	B(0.3%)	C(0.5%)	D(0.7%)
0	$1*10^4$	$1*10^4$	$1*10^4$	$1*10^4$
60	$1.2*10^4$	$1.6*10^4$	$1.48*10^4$	$1.52*10^4$
90	$1.2*10^4$	$2*10^4$	$1.6*10^4$	$2.2*10^4$
120	$1.28*10^4$	$2.6*10^4$	$2.0*10^4$	$2.4*10^4$
180	$1.4*10^4$	$4*10^4$	$2.8*10^4$	$3.5*10^4$

يبين المخطط (1) أعداد العصيات في العينات خلال الأزمنة (0,60,90,120,180)min.



المخطط(1):أعداد العصيات في العينات(A,B,C,D).

"أظهرت نتائج العدّ الميكروبي للبكتيريا اللبنية بعد إضافة البادئ إلى الحليب المبستر عند 95°C لمدة 5 دقائق أن الأعداد الابتدائية لكلٍّ من البكتيريا اللبنية العصوية (Lactobacilli) والبكتيريا اللبنية الكروية (Cocci) كانت أقلّ من القيم المتوقَّع الحصول عليها نظريًا بالاستناد إلى تركيز البادئ المعلن، حيث سُجِّل متوسط قدره $1*10^4$cfu/ml للعصويات و $1.25*10^4$cfu/ml للمكورات. وعلى الرغم من هذا الانخفاض النسبي في العدد الابتدائي، فقد أظهر نظام التخمر كفاءة واضحة، إذ انخفضت قيمة pH إلى مستوى النهاية المطلوب (4.6) ضمن الزمن المتوقع للتخمر، مما يشير إلى أن الكمية الفعلية من الخلايا الحية في البادئ كانت كافية لبدء عملية التخمر وإتمامها بكفاءة.

ويُحتمل أن يعود الاختلاف بين العدد النظري والعدد المقاس إلى عوامل تقنية مثل تباين حيوية البادئ بسبب ظروف التخزين، أو احتمالية حدوث فقدٍ خلال عمليات تحضير

المخففات والزرع، أو عدم تجانس توزيع البادئ مباشرة بعد إضافته. ومع ذلك، فإن نجاح عملية التخمر وانخفاض الـpH بالشكل الطبيعي يدعم موثوقية النتائج ويؤكد صلاحية الظروف المستخدمة.

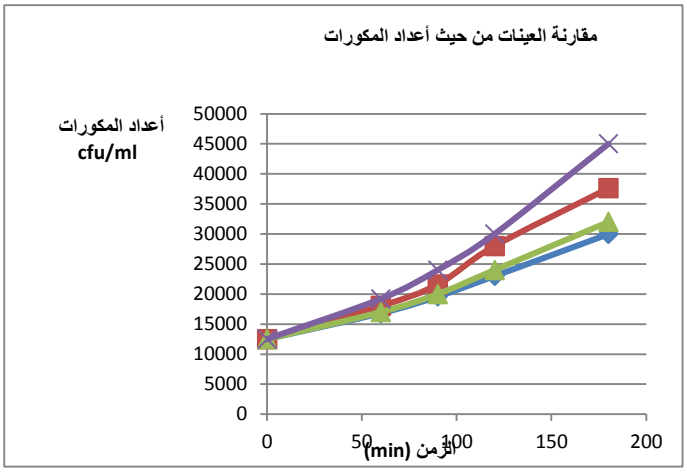
أظهرت إضافة السبيرولينا إلى الحليب خلال التخمر اللبني تأثيرًا واضحًا على حركية نمو البكتيريا اللبنية العصوية والكروية، إلا أن هذا التأثير لم يكن خطيًا، بل ارتبط بتركيز السبيرولينا ونوع البكتيريا النامية. فقد سجّلت البكتيريا العصوية أعلى معدل نمو عند تركيز 0.35% مما يشير إلى أن هذا التركيز يمثّل المستوى الأمثل لتحفيز العصويات. ويُعزى ذلك إلى احتواء السبيرولينا على نسب مرتفعة من الحموض الأمينية، المعادن والفيتامينات التي تعمل كمغذيات محفّزة للعصويات، وهو ما تدعمه عدة دراسات أشارت إلى فعالية المستخلصات الطحلبية في تعزيز نمو الـ *Lactobacillus spp*. عند تراكيز متوسطة (Beheshtipour et al., 2012; Al-Dhabi et al., 2017).

يظهر الجدول(4) تأثير إضافة السبيروانا في أعداد البكتيريا اللبنة الكروية أثناء الساعات الثلاث الأولى من التخمر اللبني للعينات عند درجة حرارة 45°C بعد الزرع على وسط M17 agar.

جدول (4): أعداد البكتيريا اللبنة الكروية في العينات خلال min (180-120-90-60-0).

الزمن(min)	العينات تبعاً لـ نسبة السبيرولينا المضافة (%)			
	A	B	C	D
0	$12.5*10^4$	$12.5*10^4$	$12.5*10^4$	$12.5*10^4$
60	$1.68*10^4$	$1.8*10^4$	$1.7*10^4$	$1.92*10^4$
90	$1.96*10^4$	$2.16*10^4$	$2*10^4$	$2.4*10^4$
120	$2.3*10^4$	$2.6*10^4$	$2.4*10^4$	$3*10^4$
180	$3*10^4$	$3.76*10^4$	$3.2*10^4$	$4.5*10^4$

يبين المخطط(2) أعداد المكورات في العينات خلال الأزمنة (0,60,90,120,180)min.



المخطط(2):أعداد المكورات في العينات(A,B,C,D).

في المقابل، أظهرت البكتيريا الكروية نمطًا مختلفًا، إذ حققت أعلى نمو عند تركيز 0.7%مما يشير إلى قدرتها الأعلى على استغلال البروتينات والببتيدات والسكريات العضوية الموجودة في السبيرولينا عند مستويات مرتفعة. وقد أشارت دراسات سابقة إلى أن *Streptococcus thermophilus* و *Lactococcus lactis* تُظهر استجابة إيجابية أكبر للإضافات البروتينية والنيتروجينية العالية مقارنة بالعصويات، نظرًا لقدرتها الإنزيمية على تحليل الببتيدات سريعًا (González et al., 2010).

توافقت هذه النتائج مع عديد من الدراسات التي توضح أن الإضافات الطحلبية مثل السبيرولينا غالبًا ما تُحدث استجابة غير خطية (Non-linear response) للبكتيريا اللبنية، إذ تستفيد العصويات بشكل أكبر من التراكيز المتوسطة، في حين قد تُظهر المكورات أعلى معدلات النمو عند تراكيز مرتفعة (Batista et al., 2019; Hernández et al., 2022). ويعكس ذلك اختلاف المتطلبات الغذائية وآليات الاستقلاب بين الأنواع البكتيرية خلال التخمر.

4-1-2-عند انتهاء التخمر اللبني:

يظهر الجدول(5) تأثير إضافة السبيروانا في أعداد البكتيريا اللبنة الكروية والعصوية بعد 24ساعة من التخمر اللبني للعينات عند درجة حرارة 37°C

جدول (5): أعداد البكتيريا اللبنة العصوية والكروية في العينات بعد 24 ساعة من التخمر .

العينة	المكورات *Streptococcus thermophilus*	العصيات *Lactobacillus bulgaricus*
A شاهد	$1.37*10^7$	$1.50*10^5$
0.3%spirulina B	$8.19*10^7$	$6.50*10^8$
0.5%spirulina C	$13.00*10^7$	$3.87*10^7$
0.7%spirulina D	$35.2*10^7$	$2.13*10^8$

أظهرت نتائج النمو البكتيري أن أعداد المكورات اللبنية (Cocci) بعد 24 ساعة من التخمر عند 37°C تراوحت بين $1.37*10^7$CFU/mL في عينة الشاهد بدون سبيرولينا، ووصلت إلى$35. 2*10^7$ CFU/mL في عينة 0.7% سبيرولينا. في المقابل، أظهرت العصيات اللبنية أعدادًا أقل بشكل عام، حيث تراوحت بين$1.5*10^5$ CFU/mL للشاهد و $2.13*10^8$ CFU/mL لعينة0.7% سبيرولينا.

تفسير هذه النتائج يمكن فهمه من خلال الخصائص البيولوجية للبكتيريا اللبنية: المكورات ***Streptoccocus*** تميل إلى النمو السريع في المراحل المبكرة من التخمر، نظراً لقدرتها على استهلاك اللاكتوز بسرعة وإنتاج حمض اللبن، مما يزيد من عددها في الفترات الزمنية القصيرة. بينما تظهر العصيات مثل ***Lactobacillus*** نمواً أبطأ في البداية، لكنها قد تصل لاحقًا إلى أعداد كبيرة في الوسط المناسب، خصوصاً عند وجود عوامل غذائية محفزة.

وجود السبيرولينا في الوسط أظهر تأثيرًا واضحًا على النمو البكتيري، إذ زادت نسب السبيرولينا من معدل نمو كل من المكورات والعصيات، مع وصول العينات ذات النسبة

الأعلى (0.7%) إلى أعلى أعداد بعد 24 ساعة. هذا يتوافق مع ما أظهرته الدراسات الحديثة، حيث يمكن للسبيرولينا أن تزود الوسط بمركبات غذائية أساسية مثل الحموض الأمينية، الفيتامينات والمعادن التي تدعم نمو البكتيريا اللبنية وتحسن من قدرتها على التكاثر (Niccolai et al., 2020).

بالمقارنة مع المراجع العلمية، تعتبر أعداد للمكورات بين 10^7–10^8 cfu/ml بعد 24 ساعة ضمن القيم المعقولة والمُبلغ عنها في الحليب المخمر عند 37°C، حيث أظهرت الدراسات أن تلك السلالات يمكن أن تصل إلى 10^7–10^8 CFU/ml تحت الظروف المثلى (Champagne et al., 1994).

أشارت النتائج أيضًا إلى أن المكورات تنمو أسرع وتصل لأعداد أعلى من العصيات في معظم العينات، وهو ما يتفق مع الدراسات السابقة التي بينت أن المكورات تُعتبر أكثر نشاطاً في بداية التخمر، بينما العصيات تستمر بالنمو بشكل تدريجي وتستجيب بشكل أكبر للتحسينات الغذائية مثل إضافة السبيرولينا.

4-2-نتائج الاختبارات الفيزيائية والكيميائية:

يظهر الجدول (6) نتائج تأثير إضافة السبيرولينا في العينات بعد 24 ساعة من حيث القدرة المضادة للأكسدة، قيم الـpH والحموضة.

الجدول (6) نتائج تأثير إضافة السبيرولينا في العينات بعد 24 ساعة من حيث القدرة المضادة للأكسدة، قيم الـpH والحموضة.

نسبة السبيرولينا المضافة%	القدرة المضادة للأكسدة (%)	قيم الـ pH	النسبة المئوية للحموضة %
A شاهد	31.09±2.77	4.51±0.01	0.90±0.01
0.3%spirulina B	37.10±1.92	4.21±0.04	1.17±0.03
0.5%spirulina C	42.23±1.79	4.15±0.01	1.24±0.03
0.7%spirulina D	42.63±1.25	4.01±0.02	1.25±0.01

تُظهر النتائج أن إضافة السبيرولينا إلى اللبن المخمر تؤثر بشكل ملحوظ على الحموضة (pH)، النسبة المئوية للحمض، والقدرة المضادة للأكسدة. عند زيادة نسبة السبيرولينا من 0 إلى 0.7% لوحظ انخفاض تدريجي في قيمة pH من 4.51 إلى 4.01، أي انخفاض بمقدار 0.50 ، مع زيادة النسبة المئوية للحمض من 0.90% إلى 1.25%، أي زيادة قدرها 0.35%. هذا الانخفاض في pH وزيادة الحموضة يعكس النشاط المتزايد للبكتيريا اللبنية نتيجة توفر عناصر غذائية إضافية في السبيرولينا، وهو ما يتوافق مع نتائج الدراسات

السابقة التي أظهرت تعزيز النشاط الحمضي للبكتيريا عند إضافة المكملات الغنية بالبروتينات والمعادن والفيتامينات (Mansour et al., 2020; Karkouch et al., 2021).

بالنسبة للقدرة المضادة للأكسدة، ارتفعت القيم بشكل ملحوظ مع زيادة السبيرولينا. ارتفعت القدرة المضادة الأكسدة من 31.09 إلى 42.63، أي زيادة مقدارها 37.11%. ويُعزى هذا الارتفاع إلى احتواء السبيرولينا على مركبات مضادة للأكسدة قوية مثل الفيكوسيانين، β-carotene والفينولات، تساهم في تحسين القدرة المضادة للأكسدة للبن المخمر، وهو ما يتوافق مع نتائج (Becker, 2007; Alvarado et al., 2019).

بشكل عام، أظهرت هذه النتائج أن السبيرولينا تعمل كعامل مزدوج: تعزيز النشاط الميكروبي لإنتاج الحمض اللبني وتحسين الخصائص الوظيفية للبن من خلال زيادة القدرة المضادة للأكسدة، مع ملاحظة أن تأثيرها على الحموضة يصل إلى حد التشبع عند 0.5-0.7% من الإضافة(Batista et al.,2017;Barkallah et al.,2017).

4-3-نتائج الاختبارات الحسية :

- تظهر الجدول (7) تأثير إضافة السبيرولينا على عينات اللبن المتخمر بنسب (0.3-0.5-0.7-)% من الناحية الحسية.

جدول (7): نتائج الاختبارات الحسية للعينات(B-C-D-E-F-G) وفقاً للدرجات

نسبة إضافة السبيرولينا (%)	اللون	الطعم	الرائحة	قبول عام
A	6	5	6	6
B	9	9	9	10
C	9	9	9	10
D	4	7	7	8

تُعطى كل صفة الدرجة 10 حيث الدرجات :

2-4: غير محبب.

5-6: طبيعي.

7-8:جيد.

9-10: جيد جداً.

عينةB : طعم مقبول لدى التذوق لا يختلف عن طعم اللبن العادي بشكل كبير مع لون أخضر خفيف وقوام متماسك.

عينةC: الطعم حامضي ويوجد نكهة مميزة مع رائحة لطيفة واللون الأخضر الواضح وهذه المواصفات مقبولة .

عينةD : الطعم حامضي ويوجد نكهة مميزة مع رائحة قوية ولطيفة واللون الأخضر أكثر وضوحاً وهذه المواصفات ممكن أن تكون غير محببة لبعض الأشخاص ولكنها مقبولة للبعض.

خامساً: الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1-السبيرولينا تعمل كمحفز نمو للبكتيريا اللبنية .

2-سجلت البكتيريا اللبنية العصوية أعلى معدل نمو عند تركيز spirulina0.3% حيث بلغت أعدادها $4*10^4$ cfu/ml بعد 180 min من بدء التخمر اللبني .

3-يعد التركيز spirulina 0.7% الأمثل لنمو البكتيريا اللبنية الكروية إذ بلغت أعدادها $4.5*10^4$ cfu/ml .

4-ارتفعت القدرة المضادة للأكسدة للعينات مع زيادة تركيز السبيرولينا بعد 24ساعة من التخمر بمقدار 37.11%.

5-انخفض رقم الـpH للعينات بشكل تدريجي وزادت النسبة المئوية للحمض (حمض اللبن) بمقدار 0.35% مع زيادة تركيز السبيرولينا.

6-أثرت السبيرولينا تأثيراً واضحاً على النمو البكتيري إذ زادت إضافة السبيرولينا من معدل نمو كل من المكورات و العصيات بعد 24ساعة.

التوصيات:

1- استخدام السبيرولينا كمعزز للنمو البكتيري.

2-دراسة تأثير إضافة السبيرولينا على حيوية ونشاط البكتيريا اللبنية أثناء فترة تخزين اللبن .

3-التوسع في الفترة الزمنية ورسم منحني النمو وإجراء التحليل الإحصائي.

4-استخدام السبيرولينا كتجربة على المستوى الصناعي لتقدير تقبل الناس لها.

سادساً: المراجع:

1-المراجع العربية:

1. .صادق، شريف، 2005 - الأحياء الدقيقة الصناعية. منشورات جامعة البعث، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية.
2. عطرة، رمضان،2017-تقانة الألبان 2. منشورات جامعة البعث، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، 2016-2017.

1-Translation of Arabic references:

1. Atraa, R,2017- **Dairy Technology 2**. Al-Baath University Publications, Directorate of University Books and Publications, 2016-2017.
2. Sadek,S.,2005-**Industrial Microbiology**. Al-Baath University Publications, Directorate of University Books and Publications,

2-المراجع الأجنبية:

3-Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., & Arasu, M. V. 2017- **Nutritional and probiotic-enhancing properties of Spirulina in dairy fermentation**. LWT – Food Science and Technology.

4-Alvarado, C., Montoya, A., & Torres, L. 2019- **Impact of Spirulina addition on antioxidant properties of fermented dairy**

products. Journal of Food Processing and Preservation, 43(7), e13945

5-Barkallah,M., Dammak,M., Louati,I., Hentati,F., Hadrich,B.,Mechichi,T., Ayadi,M,A., Fendri,I., Attia,H ., Abdelkafi ,S,2017-**Effect of Spirulina platensis fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage**. LWT - Food Science and Technology 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.071.

6-Batista, A. P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. 2017- **Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility**. Algal Research, 26, 161-171.

7-Batista, A. P. 2019- **Microalgae biomass as a novel functional ingredient in fermented milk**. Food Research International, 113, 535–543.

8-Becker, W. 2007- **Micro-algae as a source of protein**. Biotechnology Advances, 25(2), 207–210.

9-Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Haratian, P., & Safari, M. 2012- **Effects of Spirulina platensis on the growth of probiotic bacteria in fermented milk**. Food Science & Technology.

10-Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. 1994- **Challenges in the addition of probiotic cultures to foods Critical** .Reviews in Food Science and Nutrition, 34(1), 1-30.

11-de Caire G. Z. , Parada J. L , Zaccaro M. C. and de Cano M. M. S. 2000- **Elect of Spirulina platensis biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk**. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 563±565, 2000.

12-Dinçoğlu, A. H., Akça, S. S., & Çalışkan, Z. 2024- **Effect of Spirulina platensis on probiotic, nutritional, and quality properties of yogurt**. International Food Research Journal, 31(1), 157-168 .

13-González, S., Fernández-Navarro, T., & Díaz, M.2010- **Growth behavior of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii in enriched dairy media**. Journal of Dairy Science.

14-Guldas, M & Irkin, R. 2022-**The effect of Spirulina on the acidification kinetics of yogurt cultures**. LWT – Food Science and Technology, 153, 112527.

15-Hernández.,H. Nunes.,M.C. Prista.,C. and Raymundo.,A.2022- **Innovative and healthier dairy products through the addition of microalgae impact of microalgae supplementation on lactic acid bacteria dynamics during milk fermentation**. Journal applied Phycology.

16-Karkouch, I., El Yadini, M., & Zahar, M. 2021- **Effect of Spirulina supplementation on lactic acid bacteria growth and fermentation properties in yogurt**. International Journal of Food Science, Article ID 5546671.

17-Lopes, L. C., Righi, E., & Costa, J. A. V.2023-**Spirulina and its potential in biorefineries**: A review. Environmental Management and Sustainable Development, 12(2), 30-48.

18-Luwidharto, J. C. N., Rahayu, E. S., Suroto, D A., Wikandari, R., Ulfah, A., Utami,T.2022- **Effect of spirulina platemsis addition on growth of lactobacillus plantarum Dad13 and Streptococcus thermophiles Dad11 in fermented milk and**

physicochemical characteristics of the product. Food biotechnology vol 9no 3.

19-Mansour, A. F., El-Dairy, M. S., & Ahmed, S. M. 2020- **Fortification of fermented milk with plant proteins: Effects on acidity, pH, and microbial activity**. Journal of Dairy Science, 103(11), 9812–9822.

20-Niccolai, A., Bazec, K., Rodolfi L., Biondi, N., Zlatic, E., Jamnik P., & Tredici, M. R. 2020-. **Lactic acid fermentation of Arthrospira platensis (Spirulina) in a vegetal soybean drink for developing new functional lactose**-free beverages Frontiers in Microbiology, 11.560684.

21-Rose.H.,Bakashi.S.,Kanetkar.P.,Lukos.S.J.,Felix.J.,Yadv.S.P., and Paswan.V.K.2023- **Development and characterization of cultured buttermilk fortified with spirulina plantensis and its physicochemical and functional characteristics**. Dairy 4(2),271-284.

22-Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A. A. 2001- **Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. Extracts**. Journal of Agricultural Food Chemistry, 49, 4083–4089. ACCEP