المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك
المجلد (10) العدد (1)
لسنة 2018

دراسة تأثير التغليف الدقيق للمعززات الحيوية في زيادة عيوشيتها تجاة معاملات بسترة الحليب المتوفر في الأسواق المحلية

عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر[1]، مصطفى عامر شاكر[2*]
[1] استاذ دكتور، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق dramer61@yahoo.com
[2] قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق daeski.ma@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2017/9/20 تاريخ قبول النشر: 2018/1/4

الخلاصة

تم تغليف بكتريا *Lactobacillus Plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus GG* بأستخدام 3% من الجينات بتقنية البثق، وتم تغليف المعززات الحيوية المغلفة الناتجة بطبقة ثانية باستخدام 1% كايتوسان لتعزيز عيوشية المعززات الحيوية، وتم تقدير مقاومة حرارة البسترة البطيئة والسريعة لـ *Lb. plantarum* و *Lb.GG* لمعاملة السيطرة وللبكتريا المغلفة بطبقة واحدة وللبكتريا المغلفة بطبقتين بدرجة حرارة 63م لمدة 30 دقيقة و72م لمدة 15 ثانية، وتشير النتائج الى ان المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين قاومت درجات حرارة البسترة 63م لمدة 30 دقيقة و72م لمدة 15 ثانية أكثر من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة، بينما تشير نتائج معاملة السيطرة الى أنخفاض كبير في عيوشية الخلايا تجاة درجات حرارة البسترة، وبلغت النسبة المئوية لأنخفاض المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين 18.52 و14.71% للبسترة البطيئة و18.03 و17.97% للبسترة السريعة، وكانت النسبة المئوية لأنخفاض للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة (الجينات) 31.88 و25.75% للبسترة البطيئة و29.81 و26.37% للبسترة السريعة بينما كانت النسبة المئوية لأنخفاض معاملة السيطرة 74.43 و70.8% للبسترة البطيئة و72.62 و73.97% للبسترة السريعة لكل من البكتريا *Lb. plantarum* و *Lb.GG* على التوالي.

الكلمات المفتاحية: التغليف الدقيق، المعززات الحيوية، البسترة، Lactobacillus.

STUDY THE EFFECT OF MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC TO INCREASE SURVIVALITY TOWARDS MILK PASTEURIZERTREATMENT WHICH AVAILABLE IN LOCAL MARKETS.

Amer Abdulrhman Shikh Dhaher[1], Mustafa Amer Al-Bayati[2*]
[1]Prof. Dr. Department of food science College of Agriculture, University of Baghdad,Baghdad, Iraq. daeski.ma@yahoo.com
[2]Department of food science College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq, dramer61@yahoo.com

ABSTRACT

Lactobacillus Plantarum **and** ***Lactobacillus rhamnosus GG*** **were encapsulated using 3% of alginate via extrusion technique. And the probiotics capsules produced were further coated used 1% chitosan to increase the survival of probiotics, and evaluation of The heat resistance of the slow pasteurization and fast pasteurization for *Lb,pla* and *Lb.GG* for control and bacteria coated one layer and bacteria coated two layer at 63°C/ 30 minutes and 72°C/ 15 seconds. The results indicate that the Probiotic coated two layer are more resistant to pasteurization temperatures at 63°C/ 30 minutes and 72°C/ 15 seconds than the Probiotic coated one layer. While the results of the control follow a significant reduction for viability of cell toward pasteurization temperatures. The percentage of reduction of probiotics coated two layer was 19.78 and 15.54% for the slow pasteurization, 21.05 and 17.04% for the fast pasteurization. The percentage of reduction for probiotic coated one layer (Alginate) was 32.55 and 25.81% for the slow pasteurization, 30.4 and 26.7% for the fast pasteurization, while reduction of the control percentage was 74.43 and 72.16% for the slow pasteurization, 72.62 and 70.34% for the fast pasteurization to *Lb.Pla* and *Lb.GG* respectively.**

Keywords: Microencapsulation, probiotic, pasteurization Lactobacillus.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

المقدمة INTRODUCTION:

المعززات الحيوية Probiotics وهي كلمة ذات أصل يوناني والتي تعني "من أجل الحياة" وتعرف بأنها كائنات حية مجهرية توفر فائدة صحية للكائن المضيف عند تناولها بكميات كافية (**Orazio *et al*., 2015 ; FAO/WHO, 2006**)، ومن أهم أنواع المعززات الحيوية وأكثرها أستعمالاً هما جنسان *Bifidobacterium* و*Lactobacillus* وتشمل المعززات الحيوية أيضاً أنواع من *Enterococcus* و*Lactococcus* و*Oenococcus* و*Pediococcus* و *Streptococcus genera* والمتواجدة والمستوطنة في الجهاز الهضمي وأن لكل منها العديد من الفوائد التي تعود بمنافع صحية للمضيف وبشكل ملحوظ داخل الجهاز الهضمي **(Vitali *et al*., 2012).** وهناك نوع واحد من الخمائر ذات المصدر البشري هي *Saccharomyces boulardii* **(Cheng, 2015).**

أن أهم فوائد المعززات الحيوية سواء كانت سلالة مفردة أو مجموعة من السلالات هي تحسين مناعة جسم الأنسان عامة والجهاز الهضمي خاصة ولا سيما تحسين قوة الجدار المخاطي للأمعاء والعمل على تحقيق توازن النظام البيئي للنبيت المعوي في الجسم وذلك لقدرتها على الألتصاق بجدار الطبقة المخاطية للأمعاء والتي تؤدي الى منع نمو الأحياء المرضية من الأستيطان في الأمعاء ومنافستها على المواد الغذائية **(Pandey *et al*., 2015)**. أشار **Kailasapathy (2002)** ان المعززات الحيوية تؤدي الفعل العلاجي عن طريق تحسين مناعة الجسم وخفض نسة الكولسترول الكلي وتحسين قابلية تحمل اللاكتوز والوقاية من بعض أنواع السرطان، ولا يقتصر دورها العلاجي للجهاز الهضمي حصراً بل تشمل أيضاً الجهاز التنفسي والوقاية من الأصابة بالأمراض المعدية وخاصة الأطفال وغيرها من الفئات العمرية. المعززات الحيوية لها القابلية على تقليل الأصابة بتهيج القولون العصبي وأسهال المسافرين وقدرتها على خفض مستوى الأمونيا في الدم أنتاج فيتامينات B وتحسين قابلية الجسم لأمتصاص المعادن **(Shi *et al*., 2013).**

ويعرف التغليف الدقيق بانه عملية أحاطة مادة بمادة أخرى أو عملية أحاطة مادة مهمة بمادة أخرى أقل أهمية بإذ لا يتجاوز حجمها بضعة مليمترات **(Melgar-Lalanne *et al*., 2012)**، كما يعرف أيضا بأنه عملية أحاطة العامل الأساسي بمادة الجدار أو المادة الواقية وعادة تسمى المادة المغلفة بالطلاء أو الغشاء أو المادة الناقلة أو النسيج، ومن أمثلة المواد التي يتم تغليفها على مستوى علوم الأغذية هي النكهات والصبغات والمثبتات والمواد المستحلبة ومضادات الأكسدة والأنزيمات والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية والمعززات الحيوية **(Zuidam & Nedovic, 2010).**

فيما يخص تعريف التغليف الدقيق للبكتريا على أنها حماية البكتريا من العوامل البيئية القاسية بهدف خلق بيئة ملائمة لها يمكن من خلالها البقاء على قيد الحياة أثناء التصنيع والخزن وأطلاقها أو تحررها في المواقع المناسبة. أستعملت عملية التغليف الدقيق قبل أكثر من 30 سنة لحماية بعض المركبات الأساسية أو الخلايا البايولوجية من البيئة المحيطة بها والتي قد تكون مدمرة لها، وعلى العموم فأن عملية التغليف الدقيق تسمح للجزيئات للدخول أو الخروج من الكبسولة أو الحبيبة، مثل بيضة الطيور أو غلاف البذرة أو جدار السبور البكتيري أو الجلد والصدف وغيرها **(Nag, 2011).**

هناك العديد من الفوائد التي يمكن تحقيقا من خلال التغليف الدقيق منها تقليل الفائض عن طريق تقليل المادة التالفة أثناء عملية التصنيع مثل الفيتامينات إذ أن تغليف هذه العناصر يؤدي الى زيادة توافرها في المادة الغذائية، وكذلك توفير الحماية للمادة المراد تغليفها بالأضافة الى زيادة ثباتيتها تجاه الرطوبة والأوكسجين والحوامض العضوية والحرارة وتفاعلها مع المكونات الأخرى، وكذلك يمكن من خلال التغليف الدقيق التحكم في تحرير المادة المغلفة وأطلاق محتوياتها في المكان المطلوب. وتقليل النكهة والرائحة الغير مرغوبة في الأغذية عن طريق تغليف المواد المكونة لها وزيادة تقبل المستهلك للمادة الغذائية. إن التغليف الدقيق للمواد يجعل المادة المغلفة صغيرة الحجم التي يجعل من السهولة التعامل معها وسهولة تداولها. وغلفت بكتريا حامض اللاكتيك لأول مرة من قبل العالم Berl Saddles عام 1975 بأستخدام حبيبات الألجينات لغرض تخمر اليوغرت، وأستخدمت عملية التغليف الدقيق لحماية للمعززات الحيوية من الظروف الغير ملائمة من درجات حرارة وحموضة والعصارة المعوية والأوكسجين وغيرها **(Chávarri *et al*., 2012).**

وهدفت الدراسة الى حماية المعززات الحيوية من تأثير درجات حرارة البسترة عن طريق تغليف المعززات الحيوية بمواد بوليميرية طبيعية آمنة صحية والمصرح بها من قبل منظمة GRAS وضمان بقائها في المنتجات الغذائية المعززة حيويا وبأعداد عالية التي تعود بالمنافع الصحية لجسم لأنسان.

المواد وطرق العمل MATERIAL AND METHODS:

تنشيط البكتريا Activation of bacteria:

نشطت بكتريا *Lb. plantarum* و *Lb. rhamnosus GG* (المجهزة من شركة Valio الأمريكية بشكل مغلفات) إذ تم أفراغ مغلف واحد من البكتريا كلاً على أنفراد في أنبوبة تحتوي 10 مل من الوسط الزرعي De Man, Rogosa and Sharpe السائل وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة وكررت عملية التنشيط في وسط De Man, Rogosa and Sharpe السائل ثلاث مرات متتالية، ثم نشطت البكتريا كلاً على أنفراد في حليب الفرز المسترجع بنسبة 12% والمعقم عن طريق نقل 1 مل من البكتريا المنشطة في وسط De Man, Rogosa and Sharpe السائل الى 9

مل من الحليب الفرز المعقم وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وكررت عملية التنشيط في حليب الفرز ثلاث مرات متتالية.

تغليف المعززات الحيوية بطبقة أولى Microencapsulation of Probiotics With a First Layer:

غلفت المعززات الحيوية من بكتريا *Lb. pla* و *Lb. GG* تغليفاً دقيقاً بتقنية البثق بأستعمال 3% من محلول الألجينات المحضر بأذابة 3غم في 100مل من الماء المقطر وعقم بدرجة حرارة 121م وضغط 15 أنج/أنج^2 لمدة 15 دقيقة، وتم مزج 80مل من محلول التغليف مع 10مل من حليب فرز المسترجع بنسبة 12% معقم و10 من المزرعة البكتيرية لبكتريا *Lb. pla* و *Lb. GG* كلاً على أفراد وخلطها لمدة 45 دقيقة على جهاز صفيح ساخن مع محرك مغناطيسي بأستعمال محرك مغناطيسي، ثم يتم تقطير المزيج بأستعمال محقنة لتكوين الحبيبات بمحلول التصلب المكون من كلوريد الكالسيوم 0.2 مولاري و كلوريد الصوديوم 0.05 مولاري ثم يتم تحريك الحبيبات بمحلول التصلب لمدة 10 دقائق وتترك في محلول التصلب لمدة 12 ساعة وبعد انتهاء تصلب الكبسولات يتم غسل الكبسولات الناتجة بماء الببتون 0.1% للتخلص من أثار محلول التصلب ثم تحفظ بدرجة حرارة 4م لأجراء الأختبارات فيما بعد **(Ding & Shah, 2009)** .

تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية Microencapsulation of Probiotics With a second Layer:

غلفت الحبيبات الناتجة بمحلول 1% كايتوسان المعقم بدرجة حرارة 121م وبضغط 15 باوند/ أنج^2 لمدة 15 دقيقة بعد أذابة غرام واحد منه في 99مل من الماء المقطر المضاف له 1مل من حامض الخليك الثلجي لأذابة الكايتوسان ثم عدل الأس الهيدروجيني لمحلول الكايتوسان الى pH=6 بأستخدام قاعدة NaOH بتركيز 1 مولاري، إذ تم غمر 15غم من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة في 100مل من محلول 1% الكايتوسان لمدة ساعة واحدة بعدها يتم أضافة 100مل من محلول كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.1 مولاري لتعزيزأرتباط الطبقة الطبقة الأولى بالطبقة الثانية ثم يتم خلط المكونات لمدة 5 دقائق بعدها تترك الكبسولات لمدة ساعتين لأستقرار ثباتية الطبقة الثانية بعدها يتم غسل الكبسولات الناتجة بماء الببتون 0.1% للتخلص من أثار الكايتوسان ومحلول كلوريد الكالسيوم ثم تخزن بدرجة حرارة 4م لأجراء الأختبارات فيما بعد **(Sima *et al.*, 2014)**.

حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة

Enumeration of the Encapsulated Probiotics by First Layer:

تم حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة بأضافة غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة الى أنبوبة أختبار حاوية على 9مل من محلول فوسفات الصوديوم بأس هيدروجيني pH=7±0.1 و بتركيز 0.2 مولاري وخلطها على صفيح ساخن مع محرك باستعمال محرك مغناطيسي لمدة ساعة كاملة لضمان التحررالكامل للمعززات الحيوية ثم يتم عمل التخافيف العشرية اللازمة لها بأستعمال ماء الببتون، ثم ينقل 1مل من التخافيف العشرية الى أطباق بتري بعدها تصب الأطباق بواسطة وسط De Man, Rogosa and Sharpe الصلب وتحضن الأطباق لاهوائياً بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن يتم أخراج الأطباق ويتم عد المستعمرات المتكونة باستعمال جهاز عد المستعمرات، بضرب معدل المستعمرات لطبقين X مقلوب التخفيف = عدد المستعمرات **(Teoh *et al.*, 2011)**.

حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين

Enumeration of the Encapsulated Probiotics by :Second Layer

تم حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين بأضافة غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين الى أنبوبة أختبار حاوية على 9مل من محلول سترات الصوديوم بأس هيدروجيني pH=6.3±0.1 وبتركيز 0.1 مولاري وخلطها على صفيح ساخن مع محرك باستعمال محرك مغناطيسي لمدة ساعة كاملة لضمان التحررالكامل للمعززات الحيوية ثم يتم عمل التخافيف العشرية اللازمة لها بأستعمال ماء الببتون، ثم ينقل 1مل من التخافيف العشرية الى أطباق بتري بعدها تصب الأطباق بواسطة وسط De Man, Rogosa and Sharpe الصلب وتحضن الأطباق لاهوائياً بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن يتم أخراج الأطباق ويتم عد المستعمرات المتكونة باستعمال جهاز عد المستعمرات، بضرب معدل المستعمرات لطبقين X مقلوب التخفيف = عدد المستعمرات **(Sima *et al.*, 2014)**.

مقاومة درجة حرارة البسترة Resistance of Pasteurization Temperatures:

تم أختبار مقاومة درجة حرارة البسترة البطيئة 63م لمدة 30 دقيقة ودرجة حرارة البسترة السريعة 72م لمدة 15 ثانية، عن طريق أضافة 2غم من معاملة السيطرة والمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين كلاً على أنفراد الى أنبوبة أختبار حاوية على 20مل من حليب الفرز المعقم وتعريض الأنبوبة الى درجات حرارة البسترة بأستخدام حمام مائي، ثم تبرد الأنبوبة بواسطة حمام ثلجي بعدها يتم أحلال اغلفة المعززات الحيوية كما ذكر سابقا وأحتساب الأعداد الحية بطريقة صب الأطباق القياسية بأستخدام الوسط الزرعي De Man, Rogosa and Sharpe الصلب ثم تحضن الأطباق لاهوائياً بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة **(Samar *et al.*, 2013)**.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION:

تأثير عملية التغليف الدقيق بالأعداد الحية Effect of Microencapsulation in Live Numbers:

يبين (الجدول، 1) تأثير عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة من الألجينات والطبقة الثانية من الكايتوسان في الأعداد الحية لكلاً من بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG*، إذ كانت الأعداد الحية لكل من بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* 13.26 و 13.22 دورة لوغاريتمية/مل قبل عملية التغليف الدقيق على التوالي وانخفضت أعدادها الحية بعد عملية التغليف الدقيق بالطبقة الأولى الى 10.69 و 11.31 دورة لوغاريتمية/غم على التوالي، وانخفضت أعدادها الحية بعد عملية التغليف الدقيق بالطبقة الثانية الى 10.21 و 10.74 دورة لوغاريتمية/غم على التوالي.

جدول (1): يبين الأعداد الحية وحجم الكبسولات الناتجة جراء عملية التغليف للمعززات الحيوية.

الخصائص / البكتريا	لوغارتم الأعداد الحية قبل التغليف	لوغارتم الأعداد الحية بعد التغليف بطبقة أولى	لوغارتم الأعداد الحية بعد التغليف بطبقة ثانية	قطر الكبسولات المغلفة بطبقة ثانية بالملم	قطر الكبسولات المغلفة بطبقة ثانية بالملم
Lb.pla	13.26	10.69	10.21	0.1±2.31	0.1±2.63
Lb.GG	13.22	11.31	10.74	0.1±2.17	0.1±2.44

تبين النتائج أن عملية التـغليف الدقيق للمعززات الحيوية بتقنية البثق أدت الى أنخفاض أعداد بكتريا *Lb.pla* حوالي ثلاث دورات لوغاريتمية وبكتريا *Lb.GG* حوالي دورتين لوغاريتميـة وهـذه النـتيجة تتفق مع **Rathar *et al.* (2017)** بانخفاض ثـلاث دورات لوغاريتميـة عـنـد التغليف لبكتريا *Lb. pla NCDC201* و *Lb. casei NCDC297* بطبقتين من الألجينات، وقد يعود سبب أنخفاض أعداد المعززات الحيوية عند التغليف الدقيق ذلك الى استعمال المزرعة البكتيرية بنسبة10% من المحاليل الكلية المستعملة في عملية التغليف الدقيق التي تودي الى أنخفاض الأعداد الحية بمقدار 1 أو 2 أو 3 دورات لوغاريتميـة/غم، وربما يعود ذلك الى حساسية أو عدم مقاومة المعززات الحيوية للتغليف الدقيق باستعمال تـقنية البثق، ونوع المادة المستعملة، وتركيزها في التغليف الدقيق وحجم الحبيبة واحتمالية تأثير كلوريد الكالسيوم (عامل التصلب) في أعداد المعززات الحيوية فضلاً عن احتمالية تأثير سرعة المزج العالية لمادة التغليف مع المزرعة البكتيرية بسبب حساسيتها الى مواد التغليف أثناء عملية التغليف الدقيق في أعداد المعززات الحيوية، كذلك اختلاف قابلية تركيز، وانتشار أنواع المعززات الحيوية داخل الحبيبة عند حساب الأعداد الحية **(Rathar *et al.*, 2017 ; Cheng, 2015)**.

وأشار**Trabelsi *et al.* (2013)** الى أن أعلى نسبة من أعداد بكتريا *L. plantarum TN8* يمكن الحصول عليها عند استعمال مزرعة بكتيرية ذات حمولة 10^{10} (و.م.م/ مل) وبتركيز بنسبة 2% من مادة الألجينات كمادة مغلفة مع كلوريد الكالسيوم كمحلول تصلب بتركيز 0.45 مولاري هي 80.98%، وبين **Iravani *et al.* (2015)** أن تقنية البثق التي أستعملت في عملية التغليـف الدقيق للمعززات الحيوية من الطرائق السهلة والبسـيطـة والتي لا تـتطلب أجهزة ومعدات معقدة.

حجم الحبيبات Size of Beads:

يبين (الجدول ،1) قطر الحبيبات المتكونة جراء عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة من الألجينات والطبقة الثانية من الكايتوسان لكل من بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG*. إذ كان معدل القطر لعشرين حبيبة لكل من بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة 0.1±2.31 و0.1±2.17 ملم على التوالي والمغلفة بالطبقة الثانية 0.1±2.63 و 0.1±2.44 ملم على التوالي.

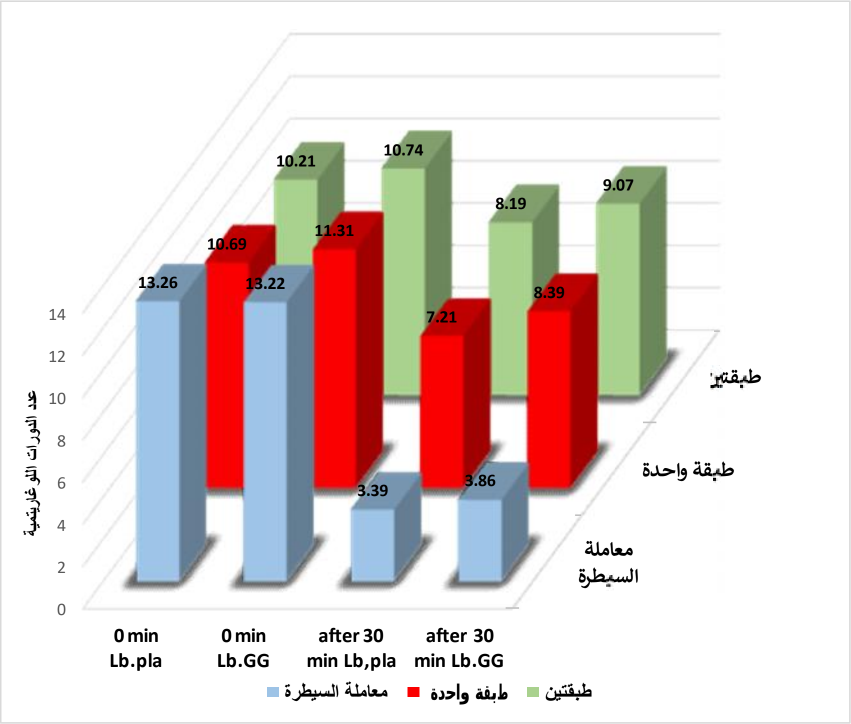
وتبين النتائج الى عدم وجود اختلافات كبيرة وواضحة بين أحجام وأقطار الحبيبات المتكونة بين بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة نتيجة استعمال نفس الظروف والمكونات المستعملة في عملية التغليف الدقيق بتقنية البثق لكلا البكتريتين، وأن الأقطـار الـتـي حـصـلـنـا عليها عند تغليف المعززات الحيوية بتقنية البثق مقارب من القطر الذي استحصل علية **Adelfo *et al.* (2015)** عند تغليف بكتريا *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus reuteri* عند استعمال تقنية البثق وباستعمال مادة الألجينات بتركيز 3% إذ كان قطر كل منهما بعد التغليف الدقيق 2.06 و 2.08 ملم على التوالي اعتماداً على نوع وتركيز المادة المستعملة في عملية التغليف الدقيق، وأشار **Mortzavin *et al.* (2007)** الى أن معظم أقطار حبيبات المعززات الحيوية المتكونة بطريقة البثق تكون 2-3 ملم، وأن قطر الحبيبات المتكونة بعملية البثق يعتمد على قطر فوهة المحقنة المستعملة فــي عملية تقطير محلول التغليف الى محلول التصلب، أيضاً يؤدي نوع وتركيز الألجينات

ولـزوجة المحلول تؤدي دوراً مهماً في حجم الحبيبات الناتجة إذ كلما قل تركيز ألجينات الصوديوم كلما صغر قطر الحبيبات المتكونة.

كذلك الأحجام والأقطار التي تم الحصول عليها عند تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية مـقـاربة لـمـا وجـدتـه **Sima *et al.* (2014)** عند تغليف بكتريا *Lb. acidophilus* بالطبقة الثانية باستعمال الكايتوسان بتركيز 0.4% إذ كان قطر الحبيبات المغلفة بطبقتين أكبر من الحبيبات المغلفة بطبقة واحدة بمقدار 200 مايكرومتر، نتيجة ارتباط الكايتوسان بالمعززات الحيوية المغلفة بمادة الألجينات بطبقة واحدة والتي تزيد من أحجام وأقطار المعززات الحيوية المغلفة بالطبقة الثانية، إذ يعزى سبب الارتباط الى أن مجاميع الأمين ذات الشحنة الموجبة للكايتوسان ترتبط مع المجاميع الكاربوكسيلة السالبة الشحنة في الألجينات التي تؤدي الى زيادة حجم الحبيبات، كذلك أن فعالية الكايتوسان تعتمد بشكل كبير على نسبة تركيز الكايتوسان ونسبة النقاوة فضلاً عن درجة إزالـة مـجاميع الأسـيتال التي تزيد مـن الشحنة الموجبة للكايتوسان، وبالتالي تزيد من فعاليته وقوة ارتباطه بالألجينات التي تكون ذات شحنات سالبة **(Ariful *et al.*, 2010)**.

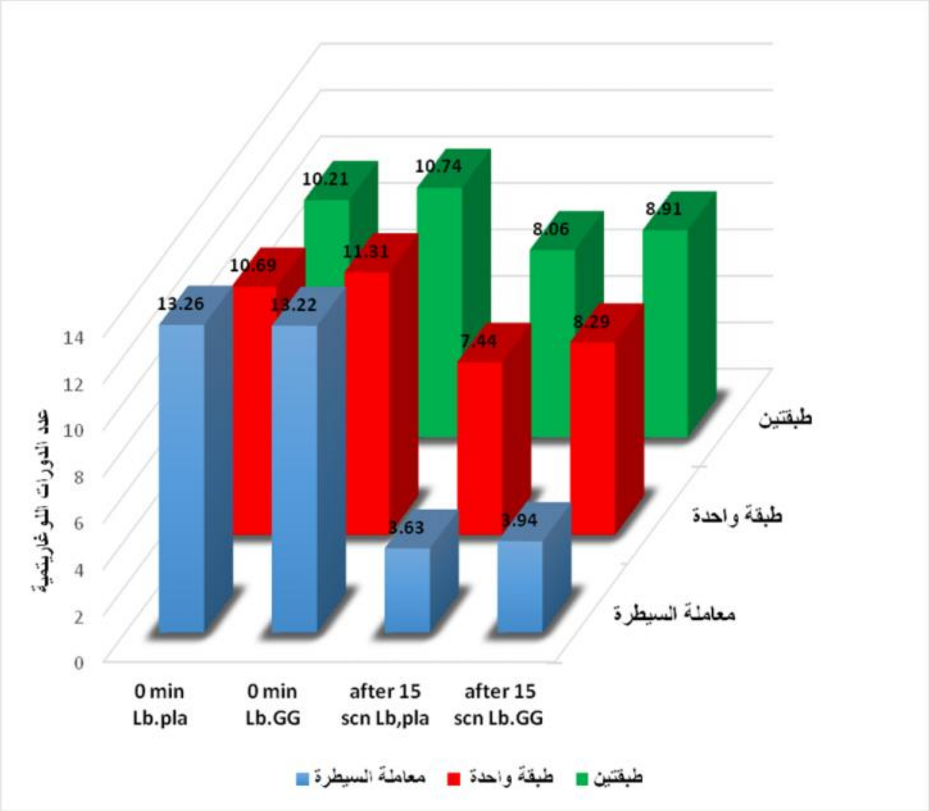
مقاومة درجات حرارة البسترة Resistance of Pasteurization Temperatures:

يبين (الشكل 1) تأثير معاملة البسترة البطيئة بدرجة حرارة 63م لمدة 30 دقيقة في أنخفاض الأعداد الحية لكل مـن بكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* لمعاملة السيطرة، إذ انخفضت الأعداد من 13.26 و 13.22 دورة لوغاريتمية قبل المعاملة الحرارية الى 3.39 و 3.86 دورة لوغاريتمية/مل بعد المعاملة على التوالي وبلغت عدد الدورات اللوغاريتمية المنخفضة 9.87 و 9.36 دورة لوغارتمية و بنسبة أنخفاض 74.43 و70.8% على التوالي، بينما كان الأنخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية *Lb.pla* و *Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة 3% الجينات أقل من المعززات الحيوية لمعاملة السيطرة إذ انخفضت الأعداد من 10.69 و11.31 دورة لوغاريتمية قبل المعاملة الحرارية الى 7.21 و8.39 دورة لوغاريتمية/غم بعد المعاملة على التوالي وكانت عدد الدورات المنخفضة 3.48 و2.92 دورة لوغارتمية وبنسبة أنخفاض 32.55 و25.81% على التوالي، بينما كان الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية لبكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* الـمغلفة بطبقتيـن 3% الجينات و1% كايتوسان أقل من أنخفاض المعززات الحيوية لمعاملة السيطرة والمغلفة بطبقة واحدة، إذ انخفضت الأعداد من 10.21 و10.74 دورة لوغاريتمية/غم قـبل المعاملة الحرارية الى 8.19 و9.07 دورة لوغاريتمية/غم بعد المعاملة على التوالي وكانت عدد الدورات المنخفضة 2.02 و1.67 دورة لوغارتمية وبنسبة أنخفاض بلغت 18.52 و15.54% على التوالي.



شكل (1): تأثير درجة حرارة البسترة البطيئة بالأعداد الحية لبكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG*.

يبين (الشكل ،2) تأثير معاملة البسترة السريعة بدرجة حرارة 72م لمدة 15 ثانية في أنخفاض الأعداد الحية لكل من بكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* لمعاملة السيطرة، إذ انخفضت الأعداد من 13.26 و13.22 دورة لوغاريتمية/مل قبل المعاملة الحرارية الى 3.63 و3.92 دورة لوغاريتمية/غم بعد المعاملة على التوالي وبأنخفاض 9.63 و9.3 دورة لوغاريتمية وبلغت نسبة الأنخفاض 72.62 و70.34% وعلى التوالي، بينما كان الأنخفاض في لوغارتم الأعداد الحية للمعززات الحيوية *Lb.pla* و *Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة أقل من أنخفاض المعززات الحيوية لمعاملة السيطرة، إذ انخفضت الأعداد من 10.69 و11.31 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الحرارية الى 7.44 و8.29 دورة لوغاريتمية/غم بعد المعاملة على التوالي وبأنخفاض 3.25 و3.02 دورة لوغاريتمية وبلغت نسبة الأنخفاض 30.4 و26.7% وعلى التوالي، بينما كان الانخفاض ففي الأعداد الحية للمعززات الحيوية *Lb.pla* و *Lb.GG* المغلفة بطبقتين أقل من انخفاض المعززات الحيوية لمعاملة السيطرة والمغلفة بطبقة واحدة، إذ انخفضت الأعداد الحية من 10.21 و10.74 دورة لوغاريتمية/غم الى 8.06 و8.91 دورة لوغاريتمية/غم على التوالي وبأنخفاض 2.15 و1.83 دورة لوغارتمية، وبلغت نسبة الأنخفاض 21.05 و17.04% وعلى التوالي، وأظهرت بكتريا *Lb.GG* مقاومة أعلى وبشكل بسيط جداً من بكتريا *Lb.pla* تجاة البسترة السريعة.



شكل (2): تأثير درجة حرارة البسترة السريعة بالأعداد الحية لبكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG*.

يعد هدف المعاملة الحرارية للبسترة هو القضاء على كافة الأحياء المرضية المرضية الخضرية وتقليل الحمولة المايكروبية الى 99-90%، وعلى الرغم من أن هذه المعاملات ستؤدي الى قتل نسبة عالية من الأحياء المجهرية، الأ ان الأحياء المجهرية المقاومة للحرارة ومن ضمنها بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك، ولا سيما جنس *Lactobacillus* سوف لن يتم القضاء عليها بشكل كامل **(Lee & Kaletunc, 2002)**، وأن قدرة جنس *Lactobacillus* على مقاومة درجة حرارة البسترة بسبب امتلاكها بعض الآليات التي تعمل على حماية البكتريا عند مواجهة ظروف قاسية منها أرتفاع درجات الحرارة كما في البسترة **(Zhang & Cai, 2014)**.

ويبين (الشكل، 1 و 2) أنخفاض الأعداد الحية لمعاملة السيطرة لبكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG*، إذ بلغت النسبة المئوية للانخفاض 74.43 و72.16% بعد معاملة البسترة البطيئة على التوالي، وبلغت النسبة المئوية للانخفاض 72.62 و70.34% بعد معاملة البسترة السريعة على التوالي نتيجة تعرض الخلايا الى الإجهاد الحراري الذي يؤدي الى دخول

الخلايا في حالة الصدمة الحرارية، التي لها تأثير سلبي على هيكل وفسيولوجية الخلايا وبالتالي تؤدي الى حدوث خسائر كبيرة في عيوشية الخلايا وهي نتيجة مقاربة لما وجده **(Kim *et al*., 2008)** عند دراسة تأثير التغليف الدقيق على عيوشية بكتريا *Lb.acidophilus*، إذ إنّ الحرارة العالية تسبب مسخ بروتينات الجدار الخلوي وتغير تتابعاتها وترتيبها في الجدار الخلوي، فضلاً عن وصول التأثير السلبي للحرارة العالية في زعزعة استقرار الجزيئات الكبيرة داخل الخلية مثل الرايبوسوم والحامض النووي الرايبوزي RNA وتغيرات في سيولة الأغشية الخلوية **(Zhang & Cai, 2014)**، إنّ بقاء بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* لمعاملة السيطرة على قيد الحياة بنسبة 25.57 و27.84% على التوالي في البسترة البطيئة وبنسبة 27.38 و29.66% في البسترة السريعة على التوالي، وقد يعود سبب مقاومة المعززات الحيوية للمعاملات الحرارية الى آليات عمل جنس *Lactobacillus* في مقاوة تأثير الحرارة المرتفعة، إذ ستعمل على إنتاج أو تكوين مجموعة من البروتينات والأنزيمات المحللة للبروتينات، إذ تعمل على إعادة بناء البروتينات التالفة وإزالتها في نفس الوقت وغيرها من الآليات مثل انتاج البروتينات الوقائية، أو زيادة نشاط بعض الأجزاء الخلوية مثل الرايبوسومات **(Champomier-Vergès *et al*., 2002 ; Di Cagno *et al*., 2006)**، فضلاً عن أن المعززات الحيوية عند موتها سوف تحرر بعض مكوناتها الخلوية التي قد توفر حماية إضافية للمعززات الحيوية التي قاومة المعاملات الحرارية **(Effie & Konstantinos, 2011)**.

إن عملية التغليف الدقيق للمعززات الحيوية أدت الى حمايتها وزيادة عيوشيتها في مقاومة معاملة البسترة، إذ انخفضت أعداد بكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة، وبلغت النسبة المئوية للانخفاض 32.55 و25.81% للبسترة البطيئة على التوالي، وبلغت النسبة المئوية للانخفاض 30.4 و26.7% للبسترة السريعة على التوالي، وأظهرت النتائج أن عملية التغليف الدقيق للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة وفر حماية أفضل من معاملة السيطرة في مقاومة المعاملات الحرارية، وقد يعزى سبب تفوق المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة عن معاملة السيطرة الى استعمال مادة التغليف بالألجينات على توفير الحماية للمعززات الحيوية تجاه المعاملة الحرارية إذ تعمل على تقليل انتشار الماء داخل غلاف الحبيبة، إذ تعمل على عرقلة تغلغل الحرارة الى داخل الحبيبة فضلا عن ثبات الألجينات ضد المعاملات الحرارية العالية وبالتالي فان المعززات الحيوية المغلفة لا تدخل الى ظروف مماثلة عما هي عليه في معاملة السيطرة **(Mandal *et al*., 2006)**، أن تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية من الكايتوسان وفر دعماً إضافياً للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة ثانية اتجاه معاملة البسترة، إذ بلغت نسبة الانخفاض 19.78 و15.54% للبسترة البطيئة على التوالي وبنسبة انخفاض 21.05 و17.04% للبسترة السريعة على التوالي، وأظهرت النتائج الى أن النسبة المئوية للانخفاض انخفضت عند تغليف المعززات الحيوية المغلفة بطبقة ثانية مقارنة مع المعززات الحيوية المغلفة بطبقة، وقد يعود الى دور الكايتوسان لتوفير الدعم الإضافي كطبقة حماية ثانوية والتي تقلل من أنتقال درجات حرارة البسترة الى الغلاف الأول فضلاً عن دور أيونات الكالسيوم التي تعمل على ربط غلاف الكايتوسان بغلاف الألجينات وزيادة ثباتية الأغلفة واستقرار الحبيبات وإعطاء قوة ميكانيكية تجاه المعاملات الحرارية **(Radulovic *et al*., 2012 ; Sima *et al*., 2014)**، وهذا ما يفسر زيادة في عيوشية المعززات الحيوية تجاه المعاملات الحرارية، ان زيادة مقاومة المعززات الحيوية للمعاملات الحرارية باستعمال تقنية التغليف الدقيق ربما سيفتح الأبواب لاستعمال هذه المعززات في الأغذية التي يتطلب اعدادها معاملات حرارية مما سيسهم في زيادة أشكال وأصناف الأغذية المعززة حيوياً.

أظهرت النتائج لجميع المعاملات تفوق لبكتريا *Lb.GG* على بكتريا *Lb.pla* تجاه مقاومة درجة حرارة البسترة البطيئة وكذلك في البسترة السريعة هي نتيجة لاختلاف مقاومة المعززات الحيوية فيما بينها تجاة المعاملات الحرارية المختلفة اعتماداً على نوع وجنس المعززات الحيوية كذلك اعتماداً على مراحة نمو المعززات الحيوية، إذ تكون مرحلة الاستقرار أكثر مرحلة التي تكون فيما المعززات الحيوية أكثر مقاومةً للظروف البيئية الضارة **(Gardiner *et al*., 2000)**، كذلك تبين النتائج أن البسترة البطيئة والبسترة السريعة للمعززات الحيوية لهما نفس التأثير والقدرة على خفض الأعداد الحية للمعززات الحيوية وأن الاختلاف بين أجناس بكتريا حامض اللاكتيك فيما بينها في مقاومة والاستجابة للصدمة الحرارية ، هذا ما يفسر أختلاف الأعداد الحية بين بكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* في البسترة البطيئة والبسترة السريعة **(Effie & Konstantinos, 2011)**، فضلاً عن أن البسترة البطيئة والبسترة السريعة التي لهما نفس التاثير القاتل لبكتريا الركتسيا المسببة لحمى كيو التي تكون أكثر الأنواع الخلايا الخضرية المرضية المقاومة لدرجة حرارة التي تصل الى 63م ونفس التأثير اللازم لتثبيط أنزيم الفوسفاتيز القاعدي للتأكد من قدرة عملية البسترة السريعة والبطيئة **(Cerf & Condron, 2006)**.

:REFERENCES المصادر

I. Adeful, García-Ceja, Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(1), 482-489.

II. Ariful, I. M., Yun, C. H., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. *J Microbiol Biotechnol*, *20*(10), 1367-1377.

III. Cerf, O., & Condron, R. (2006). Coxiella burnetii and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle. *Epidemiology & Infection*, *134*(5), 946-951.

IV. Champomier-Vergès, M. C., Maguin, E., Mistou, M. Y., Anglade, P., & Chich, J. F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*, *771*(1), 329-342.

V. Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In *Probiotics*. InTech. http://dx.doi.org/10.5772/50046

VI. Cheng, F. (2015). *Microencapsulation And Viability Of A Pprobiotic In A Simulated Gastrointestinal Environment.* (Doctoral dissertation, University of Missouri-Columbia).

VII. D'Orazio, G., Di Gennaro, P., Boccarusso, M., Presti, I., Bizzaro, G., Giardina, S., & La Ferla, B. (2015). Microencapsulation of new probiotic formulations for gastrointestinal delivery: in vitro study to assess viability and biological properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(22), 9779-9789.

VIII. Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (2006). Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 4503-4514.

IX. Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*, *74*(2), 123-129.

X. Effie T. & Konstantinos P. (Eds.). (2011). Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. *Springer Science & Business Media*, *6*,127-139.

XI. FAO/WHO. (2006). *Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation,* FAO Food and Nutrition Paper No. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

XII. Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Ross, R. P. & Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human derived probiotic *Lactobacillus para casei* and *Lb. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(6), 2605-2612.

XIII. Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679-4696.

XIV. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *3*(2), 39-48.

XV. Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., & Park, H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology, 41*(3), 493-500.

XVI. Lee, J., & Kaletunç, G. (2002). Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(11), 5379-5386.

XVII. Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei NCDC-298*. *International Dairy Journal*, *16*(10), 1190-1195.

XVIII. Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., & Hernández-Sánchez, H. (2012). *Lactobacillus plantarum*: An Overview with Emphasis in Biochemical and Healthy Properties. *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications. Nova Publishing*, 1-31.

XIX. Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, *5*(1), 1-18.

XX. Nag, A. (2011). *Development of A Microencapsulation Technique For Probiotic Bacteria Lactobacillus casei 431 Using A Protein Polysaccharide Complex*: A Thesis Presented in Partial Fulfillment of The Requirements of The Degree of Masters of Technology in Food Technology at Massey University, *Palmerston North, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).

XXI. Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 7577-7587.

XXII. Radulović, Z., Mirković, N., Bogović-Matijašič, B., Petrušić, M., Petrović, T., Manojlović, V., & Nedović, V. (2012). Quantification of viable spray dried potential probiotic lactobacilli using real time PCR. *Archives of Biological Sciences*, *64*(4), 1465-1472.

XXIII. Rather, Sajad A., Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum NCDC201* and *L. casei NCDC297. LWT-Food Science and Technology*, *83*, 50-58.

XXIV. Samar, M., Esfandiari, Z. & Nateghi, L. (2013). The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation: a review. *Ann Biol Res*, *4*(4), 83-87.

XXV. Shi, L. E., Li, Z. H., Zhang, Z. L., Zhang, T. T., Yu, W. M., Zhou, M. L., & Tang, Z. X. (2013). Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. *LWT Food Sci. Techn*., 54, 147-151.

XXVI. Sima, T., Sharifan, A., Tarzi, B. G. & Panah, H. E. (2014). Assessment the possibility of probiotic jelly production using microencapsulation technique of *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, *5*(1), 143-154.

XXVII. Teoh, P. L., Mirhosseini, S. H., Mustafa, S. & Manap, M. Y. A. (2011). Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *9*(1), 69-73.

XXVIII. Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., & Salah, R. B. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *61*, 36-42.

XXIX. Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M. & Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, *31*(1), 116-125.

XXX. Zhang, H., & Cai, Y. (Eds.). (2014). *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. Springer. *1*(2), 253-306.

XXXI. Zuidam, N. J., & Nedovic, V. A. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. *Springer*, *62*(4), 3-29.