المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (12) العدد (2)
لسنة 2020

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc12.2.2020.(10)

دراسة ثباتية معدل بقاء المعزز الحيوي *Lactobacililus casei* تجاه املاح الصفراء والمعاملات الحرارية باستعمال تقنية التغليف الدقيق بالطبقات

رغد رحيم الحاتم[1]، علي خضير الركابي[2]، آمال كاظم الأسدي[3]
[1]قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. العراق raqadraheem@yahoo.com
[2]قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. العراق xxxx@yahoo.com
[3]قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. العراق xxx@yahoo.com

الاستلام 27/ 11/ 2019، القبول 19/ 1/ 2020، النشر 31/ 12/ 2020

هذا العمل تحت سياسية ترخيص من نوع CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى تحسين تقنية التغليف باستعمال احد انواع الطلاء الذي تسمى التغليف بالطبقات الذي يوفير أفضل حماية للمعزز الحيوي *casei Lactobacillus* وبطريقة البثق واستعمل مواد التغليف منها بروتينات الشرش المركزه بنسبة بروتين 80% ومواد طلاء الالجينات والكايتوسان وقد أظهرت النتائج تباين في اختلاف حاصل عملية الربط بين انواع الطلاء من خلال. درسة تأثيرثباتية المعزز الحيوي الحر والمكبسلة والمغلفة بأنواعه الثلاثة تجاه أملاح الصفراء وبتراكيز مختلفة 0 و0.3 و0.5 و0.7% عند فترات زمنيه مختلفة 0 و1و2 و3 ساعة من الحضن وسجلت أعلى ثباتية للمعزز المغلف بطبقتين عند 3 ساعات، إذ بلغ معدل بقاء البكتريا100 و89.91 و85 و82 %، بينما المعزز الحيوي الحر سجل 100 و61.61 و53و 45.8% على التوالي، في حين أختبرت ثباتية الخلايا لمعزز الحيوي تجاه المعاملات الحرارية عند ثلاث درجات حرارة 45 و55 و65م بفترات زمنية 0 و15و30 دقيقة وأظهرت النتائج ثباتية لمعزز الحيوي، إذ سجلت الخلايا المغلفة بطبقتين أعلى معدل بقاء بلغت 95.74 و92.83 و86.87% على التوالي مقارنة مع المغلفة بطبقة واحدة ثم تلتها الغير مغلفه واقل ثباتية هي الخلايا الحرة.

الكلمات المفتاحية : بروتينات الشرش المركزه، والتغليف الدقيق، انواع الطلاء، املاح الصفراء، معاملات الحرارية.

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc12.2.2020.(10)

THE USE OF MICROENCAPSULATION TECHNOLOGY WITH COATING LAYER BY LAYER TO IMPROVE THE STABILITY OF THE *Lactobacillus casei* TOWARDS THE BILE SALTS AND TREATMENT HEAT.

Raqad R. Al-Hatim[1], Ali K. Al-Rikabi[2], Amal K. Ghadban[3]
[1]Department of Food science, College of Agriculture, University of Basrah. Iraq. raqadraheem@yahoo.com
[2]Department of Food science, College of Agriculture, University of Basrah. Iraq. xxxx@yahoo.com
[3]Department of Food science, College of Agriculture, University of Basrah. Iraq. xxx@yahoo.com

Received 27/ 11/ 2019, Accepted 19/ 1/ 2020, Published 31/ 12/ 2020

This work is licensed under a CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

ABSTRACT

This study aimed to improve the microencapsulation technique using a type coating the encapsulation Layer by Layer, which provide the best protection for life Lactobacillus casei in the extrusion method and use the microencapsulation of materials of the protein concentrated by protein 80% and the coating with alginate and chitosan have the results showed the variation in the difference of the binding process encapsulation yield among the types of coating through. by studying of these the effect o stability of the bio probiotic free cell and the three types coated towards three different concentrations from bile salts 0, 0.3, 0.5 and 0.7% when the periods of time different of

zero and two and three hours at incubation the recorded highest stability with coated layer of the double layer when three hours compared to the bio probiotic free, with the survival rate 89.91, 85 and 82%, while the bio probiotic free cell record 100, 61.61 and 45.8% respectively, while tested the stability of cells are towards treatment heat three temperatures of 45, 55 and 65°C theat 0, 15 and 30 minute, the results showed stability with as recorded cells coated double layer the highest survival rate amounted to 95.74, 92.83 and 86.87% in three degrees of heat at 30 minute compared to the coated with asingle layer then it is followed by a encapsulated (Uncoating layer) and less stability are the free cells.

Keywords: Whey proteins concentrated, microencapsulation, coating type, bile salts, heat treatment.

المقدمة INTRODUCTION

تعد بروتينات الحليب احدى المكونات الاساسية التي تدخل ضمن الاغذية الوظيفية والتي هي مجموعة الاغذية التي تحتوي على بعض المكونات الغذائية ذات التأثير الصحي، وتمتاز بروتينات الحليب باستعمالها في التغليف الدقيق وبنجاح لما لامتلاكها صفات عدة مثل تكوين الهلام وملائمتها للتغليف وبالتالي تؤدي الى حماية البكتريا العلاجية وإطالة العمر الخزني فضلا عن كونها من المصادر الغنية بالببتيدات الفعالة حيوياً والتي لها تأثير تعاوني مع البكتريا العلاجية (**Lazidis *el at*., 2016; Siamand *et al*., 2014; Tripathi & Giri 2014; Vivek 2013**)، ويعد تطوير تقنيات التغليف الدقيقة وتطبيقها بنجاح لحماية المركبات الفعالة أحد الامور الاساس التي يتم اللجوء اليها للحماية الكاملة لها عند تعرضها الى الظروف التصنيعية والخزن ممايؤدي الى تدهورها بوساطة درجة الحرارة والرطوبة والاوكسجين، وكذلك تحللها في الجهاز الهضمي، عند تعرضها الى حموضة المعدة والاملاح الصفراء ووجود الأنزيمات المعوية (**Kailasapathy 2006**)، ويعتمد أنتقاء طريقة التغليف على الخواص الفيزيائية والالية للبوليمر وشحنة البوليمر وتطبيقات المواد المغلفة وموقع التحرير أو أنطلاق المركبات الفعاله وتكلفة المادة المراد التغليف بها (**Burgain *et al*., 2011; Parra-Huertas 2010**)، وتعد تقنية التغليف الدقيق بطريقة البثق والتي يطلق علها نظام القطرات هي الاكثر شيوعا في إلانتاج للغرويات في التغليف كما تمتاز به من خصائص أيجابية (**Feucht & Kwak 2013**)، ويتوقف حجم وشكل الكرات على حجم فوهة الأبرة والمسافة بينهما ومحلول التصلب وعلى تركيز البوليمر (**Mortazovian *et al*., 2007**)، كما أن طريقة الاستحلاب تمثل أحد طرائق التغليف الدقيق واسعة الاستعمال من خلال نظام المرحلة الواحده أو المرحلتين لحجز البكتريا أو أي مركبات فعاله (**Sung *el at*., 2015**)، في حين تعد طريقة التجفيف بالرذاذ الجديدة التي تم تطويرها في الوقت الحالي والتي من الممكن أن تكون بديل عن تقنية البثق والاستحلاب، وهذة الطريقة تكون مفضله عند أستعمال التغليف الدقيق للمركبات الفعالة مثل الانزيمات والزيوت والمركبات الفينولية (**Nazzar *et al*., 2012**)، وتتميز هذا الطريقه بانها غير مكلفه فضلا عن سهوله تشغيل الجهاز وامكانية حفظ المنتوج في درجة حرارة المختبر وتمتاز بانخفاض النشاط المائي مع مراعاة تحديد درجة الدخول والخروج الى المادة المستعملة وملائمتها للتطبيقات الصناعية (**Zuidam & Nedovic 2010**)، ويمكن تصنيف انواع الطلاء حسب الطريقة المتبعه والتي تتضمن الطلاء بطبقة مفردة والطلاء بطبقتين مزدوجتين فضلا عن الطلاء المركب أوالمعقد (**Calinoiu *et al*., 2019**).

المواد طرائق والعمل MATERIAL AND METHODS

تحضير اللقاح Inoculum Preparation

نشطت بكتريا *Lactobacillus casei* في الوسط السائل الأنتقائي MRS-Broth بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة بحاضنة مجهزه بغاز CO_2 بنسبة 5% ثم طوبقت مع انابيب ماكفرلاند القياسية المحضرة من قبل **Zapata & Ramirez-Arcos (2015)**.

التغليف الدقيق Microencapsulation

تحضير الكرات المكبسلة غيرالمطليه The prepation of uncoating beads

أتبعت الطريقة التي اوصى بها **Tang *et al*. (2013)** في التغليف الدقيق مع أجراء بعض التحويرات، إذ خلط بروتينات شرش الجاموس المركزه بتركيز 15% مع ماء خالي من الايونات باستخدام محرك المغناطيسي لمدة ساعتين، ثم حفظت بالثلاجة لمدة 16ساعه، أجريت المعاملة الحرارية عند درجة حراره 85م لمدة 15دقيقة في حمام مائي وعدل الاس الهيدروجيني الى 6.8 ثم برد المحلول على درجة حرارة 22م وخلط مع البكتريا بحجم 10مللتر واستعمل المازج لغرض

التجانس وبأعداد 15×10^8 واستعملت طريقة البثق بواسطة سرنجة في طبق بتري يحتوي على محلول التصلب الحاوي على كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.2 مولار المبرد ثم وضع على محرك مغناطيسي على سرعة 100 دورة/ دقيقة لحين اكتمال المحلول ولتشكيل الكرات تركت في محلول التصلب لمدة 30 دقيقة ثم غسلت مرتين بمحلول ماء معقم لغرض التخلص من محلول التصلب، وحفظت بماء مقطر معقم ثم رشحت وحفظت في أنابيب تحتوي على محلول الببتون وبتركيز 0.1% المعقم عند درجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

تحضير الكرات المطلية بطبقة مفردة Prepation of single coating beads

أتبعت الطريقة التي أشاراليها **Krasaekoopt *et al.* (2004)** مع أجراء تحويرطفيف، إذ خلط 15 غم من الكرات غير المغلفة في الفقره اعلاه مع 100 مللتر من محلول الالجينات المعقمه وبتركيز 0.17% في دورق سعته 250 مللتر ثم غلف بغلاف محكم ونقل الى حاضنة هزازة 100 بسرعة دوره/دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 37م ثم رفعت الكرات المطلية (المغلفة) من محلول الألجينات وسكبت بدورق ذي قمع مزود بورق ترشيح Whatman No.1 لغرض التخلص من محلول الالجينات ووضعت طبقة من الورق الحراري مثقب وأستغرقت هذه العملية 30 دقيقة.

تحضير الكرات المطلية بطبقتين مزدوجة Prepation of double coating beads

أتبعت الطريقة التي أشار اليها **Krasaekoopt *et al.* (2004)** في التغليف، اذ أذيب 0.4غم من الكايتوسيان بتركيز1% في 99 مللتر ماء مقطر وأضيف 0.4 مللتر حامض الخليك الثلجي وعدل الاس الهيدروجيني الى 6 ووضع على محرك مغناطيسي لمدة ساعتين ثم عقم المحلول على درجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة، وبعد التبرد غلف بالكايتوسان ونقل الى حاضنة هزازة 100 بسرعة دوره/ دقيقة لمدة 40 دقيقة بدرجة حرارة المختبر، ورفعت الكرات المطلية (المغلفة) من محلول الكايتوسان وسكبت بدورق ذي قمع مزود بورق ترشيح Whatman No.1 لغرض التخلص من محلول االكايتوسان ووضع طبقة من الورق الحراري ثم غمرت الكرات المغلفة بمحلول التصلب لمدة 10 دقائق وبعدها غسلت محلول الببتون واستعمالها أنيا دون حفظها.

تحضير الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة Release cell of encapsulate bacteria

أتبعت الطريقة الواردة في **Mathews (2007)** لغرض أطلاق الخلايا المكبسلة وحساب اعدادها.

حاصل عملية الربط Encapsulation yield (EY)

تقدير حاصل عملية حجز البكتريا داخل البوليمر وأتبعت طريقة التي أوصى بها **Arslon-Tontul & Erbas (2017)** وبتطبيق المعادلة أدناه:

$$\text{حاصل عملية التغليف البكتريا} = \frac{N_1}{N_0} \times 100$$

N_1= أعداد البكتريا cuf/ غم المنطلقة من الكرات المكبسلة والمغلفة في زمن الصفر.
N_0= أعداد البكتريا الحرةcuf/مل قبل الكبسلة (اي في محلول) .

دراسة ثباتية المعزز الحيوي أتجاة أملاح الصفراء Stability bioprobiotic of the bile salt

أتبعت الطريقة الواردة في **Li *et al.* (2011)** مع أجراء بعض التحويرات، إذ نقل 0.5 غم البكتريا المكبسلة بأنواعها الثلاث الى أنابيب أختبار تحتوي على 4.5 مل من محلول أملاح الصفراء المعقم وبالتراكيز 0.0 (control) و0.3 و0.5 و0.7% وبنفس الخطوات السابقة سحب 1 مل من الخلايا الحرة المنشطة وحضنت على درجة حرارة 37م لمدة 0 و1 و2 و3 ساعة وثم نقل 1غم من الكرات المكبسلة في محلول أطلاق الخلايا عند الاس الهيدروجيني 6.8 في حاضنه هزازة وبسرعة 100 دوره/دقيقة على درجة حراره المختبر ولمدة 10-12دقيقة لحين أكتمال أنحلال الكرات، واتبعت طريقة **Mathews (2017)** في اطلاق الخلايا ثم عد الخلايا الحره والمكبسلة المغلفة وحسب معدل بقاء البكتريا المنشطة الحرة والمكبسلة في كل ساعة أستنادا الى المعادلة التي ذكرها **Çabuk (2014)**.

دراسة تاثير تحمل المعاملات الحرارية لخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة

Effect of Treatments Heat tolerance of Cell Free and Microencapsulated

أتبعت الطريقه التي أوصى بها **Mandal *et al.* (2006)** وحسب معدل بقاء للبكتريا المنشطة الحرة والمكبسلة في كل الوقات أعلاة أستنادا الى المعادلة التي ذكرها **Çabuk (2014)**.

التحليل الأحصائي Statiscal analysis

صممت التجارب الإحصائية للبيانات أستنادا الى التصميم العشوائي الكامل Desingn randomized complete (DRC) وحللت النتائج ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز 2018 بأستعمال البرنامج Special program for statistical system (SPSS) وأختيرت العوامل المدروسة بالإعتماد على أقل فرق معنوي بين المتوسطات (L.S.D) عند مستوى إحتمالية (0.05).

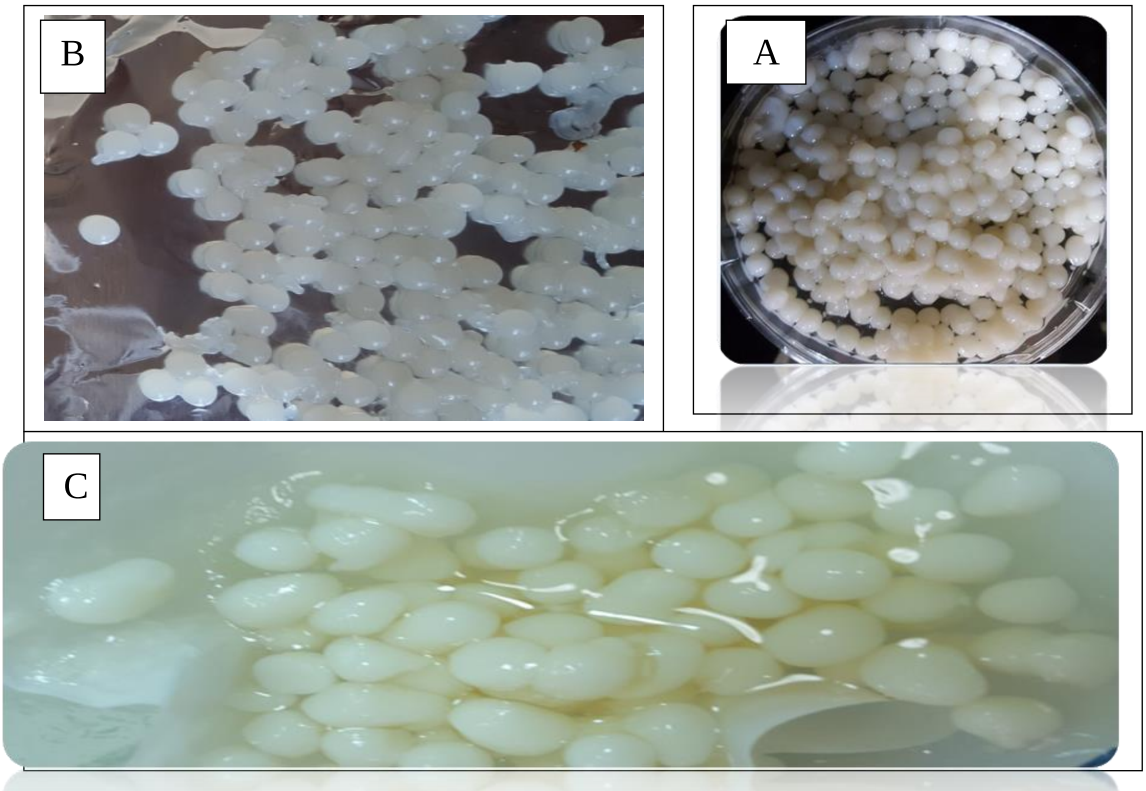
النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

حاصل عملية تغليف البكتريا Encapsulation Yield (EY)

يوضح (الجدول، 1) و(الشكل، 1) حاصل عملية التغليف لبكتريا *Lactobacillus casei* الكرات المكبسلة والمغلفة، إذ قدرت حاصل عملية التغليف بتطبيق المعادلة الرياضية الموصوفة في حاصل عملية التغليف الكرات بانواعها ثلاث، إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية (P ≤0.05) في حاصل عملية الربط وتُشير النتائج الى تباين حاصل عملية الربط بين الانواع من خلال معاينة (الجدول، 1)، إذ يلاحظ أن حاصل عملية الربط للكرات المكبسلة غير المطلية سجلت أعلى نسبة مئوية بلغت 95.74%، بينما كانت الكرات المطلية بطبقة واحدة بلغ حاصل الربط 91.05%، ثم تلتها الكرات المكبسلة والمطلية بطبقتين، إذ سجلت أقل حاصل عملية الربط بلغت 89.74% ويمكن الاستنتاج أن أنخفاض عملية الربط قد يعزى الى العمليات الميكانيكية أثناء التغليف والتفاعلات بين الطبقات التي تساهم في اختزال المعزز الحيوي في الكرات المكبسلة بطبقة واحدة مقارنة بطبقتين، بينما يعزى أرتفاع كفاءة حاصل ربط لكرات المكبسلة غير مطلية يعود الى التصاق المعزز الحيوي على سطح الكرات، لذا أتسمت عملية التغليف بالطبقات في تحسين معدل بقاء البكتريا وزيادة قطر الكرات وخفض المساميه للبوليمر وزيادة اللزوجة والتي تساهم في توفير أكثر حماية لحجز ورفع معدل بقاء المعزز الحيوي عند تعرض لظروف قاسية من الاس الهيدروجيني وانزيمات وأملاح الصفراء ومن هنا يستدل على رفع كفاءة عملية الربط، كما أثبتت الدراسات أن الكرات المكبسلة بالنشأ والمغلفة بالالجينات بطبقة واحدة لا تعطي حماية جيدة للبكتريا وذلك لسرعة تحللها خلال تعرضها الى الاس الهيدروجيني المنخفض وفي حالة الكرات المكبسلة والمغلفة بالالجينات، اذ يعمل التغليف بطبقتين على تحسين ثباتية الكرات المغلفة ويعزى السبب الى أن التغليف يوفر أفضل حماية للمعزز الحيوي وان طبقة الكايتوسان أتصفت بألاكثر سمكا والوزن جزئي عالي فضلا عن زيادة حجمها وقطرها وأختزال مساميتها **(Ivanovska *et al.*, 2012)**، وفسر **Chen *et al.* (2017)** أن هناك عوامل تساهم في تحسين معدل بقاء البكتريا عند التغليف الدقيق والمتمثلة بالشكل كروي وقطر ونوع مواد تغليف، إذ أتسمت الكرات غير المغلفة (بروتينات الشرش المعزولة) بقطر 81.8µm وبكفاءة ربط بلغت 96.35%، في حين كانت الكرات المغلفة بطبقة واحدة (الالجينات) تمتلك قطر 118.1 µm وكفاءة عملية الربط 95.28% وعلى الرغم من بأنخفاض كفاءة الربط الكرات المغلفة بطبقة واحدة لكنها أتسمت بقوة الهلام الذي جعلة غير قابل الذوبان مما ادئ الى أضفاء صفة المقاومة اتجاه التحلل الانزيمي ومقاومتها املاح الصفراء وبذلك أعطت أفضل حماية في الحجز مع زيادة معدل بقاء البكتريا عند تعرضها للظروف أعلاه ، وكما جاءت النتائج أعلى مما توصل إليه **Ayama *et al.* (2014)** عند دراستهم كفاءة عملية الربط في التقنية التغليف الدقيق وقد تراوحت حاصل كفاءة الربط بين 80-82% أعتمادا على تركيز المادة المستعملة، وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما حصل عليه **Pitigraisorn *et el.* (2017)** عند تقدير كفاءة عملية الربط لبكتريا *Bifidobacterium* BB-12 والتي بلغت 85.0 -95.3 %.

جدول (1): حاصل عملية التغليف للبكتريا الحرة والمغلفة بأنواعها الثلاث.

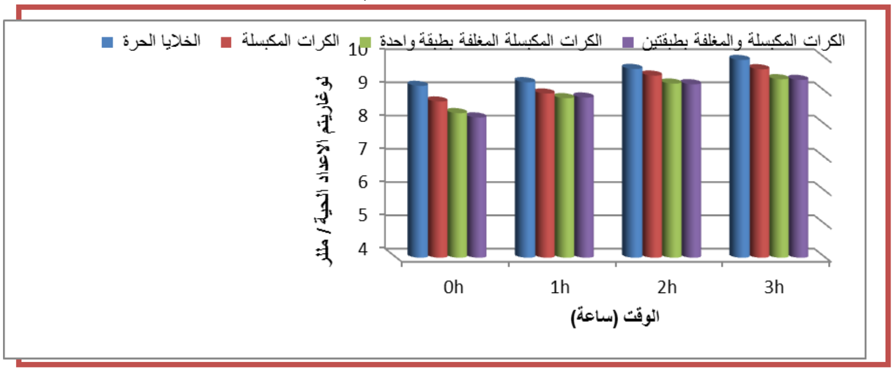
نوع التغليف Coating Type	ألاعداد البكتريا قبل الاضافة cuf/مللتر	الاعداد البكتريا بعد الاضافة cuf/مللتر	حاصل عملية الربط (%)
البكتريا الحرة Free cell	9.17	9.17	100
المكبسلة غير مغلفه Uncoating	9.17	8.78	95.74
المغلفة بطبقة واحدة Single layer	9.17	8.35	91.05
المغلفة بطبقتين Double layer	9.17	8.23	89.74
حاصل عملية الربط RLSD:2.2354 و LSD:1.482			



شكل (1): التغليف الدقيق مع انواع الطلاء.
A- كرات المكبسلة غير مطلية Uncoating
B- كرات المطلية بالالجينات بطبقة واحدة Single layer
C- كرات المطلية بالكايتوسان بطبقتين Double layer

دراسة ثباتية المعزز الحيوي تجاه أملاح الصفراء الحرة والمكبسلة والمغلفة Probiotic stability

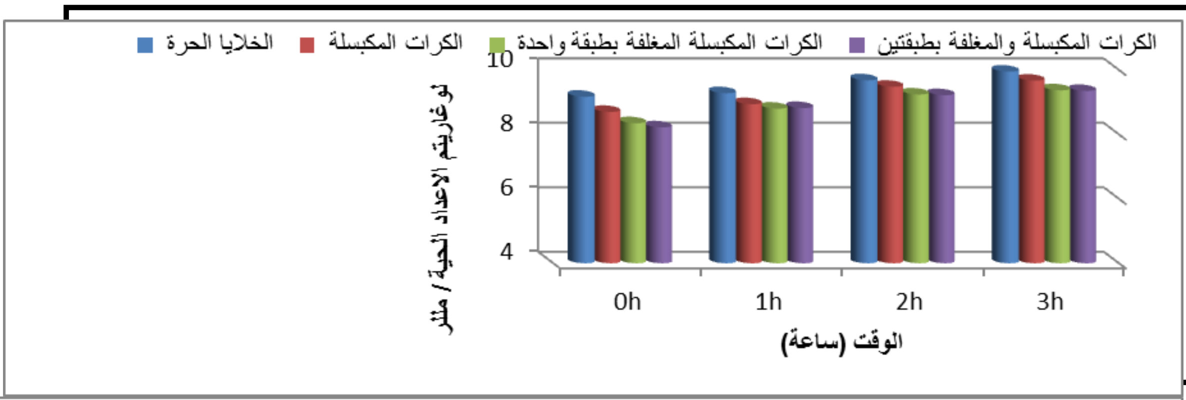
أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) في معدل بقاء البكتريا ويوضح (الشكل، 2 و(الجدول، 1) التغير الحاصل في لوغاريتم الأعداد الحية/ مللتر ومعدل بقاء البكتريا من خلال دراسة ثباتية الخلايا *casei Lactobacillus* الحرة والمكبسلة بأنواعها عند تركيز 0% بدون املاح الصفراء بعد 1 و2 و3 ساعة من الحضن على درجة حرارة 37م، اذ اظهرت النتائج أن جميع المعاملات ابدت زيادة في اعداد البكتريا وهذا دليل قاطع على أن البكتريا تستطيع النمو في وسط MRS وهو أحد الاوساط الانتقائية للمعزز الحيوي *L .casei*



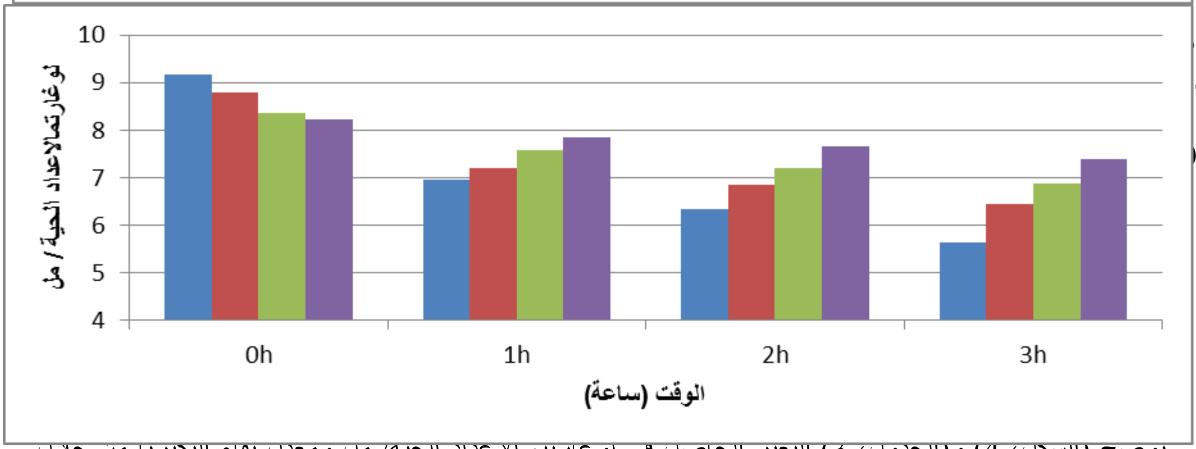
شكل (2): ثباتية الخلايا المعزز الحيوي *Lactobacillus casei* الحرة والمكبسلة بأنواعها بدون املاح الصفراء 0%.

يوضح (الشكل، 3) و(الجدول، 2) التغير الحاصل في لوغاريتم الأعداد الحية/ مللتر ومعدل بقاء البكتريا من خلال دراسة ثباتية الخلايا *L .casei* الحرة والمكبسلة بأنواعها تجاه تركيز 0.3% من املاح الصفراء بعد 1 و2 و3 ساعة من الحضن، إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) وأن نسبة معدل بقاء البكتريا أبدى أنخفاضا تدريجيا أعتمادا على طبيعة التغليف، إذ دلت النتائج أن بكتريا *Lactobacillus casei* المكبسلة والمغلفة أنخفاضت تدريجياً في النسب المئوية لمعدل بقاء البكتريا أن الخلايا المغلفة بطبقتين والتي أبدت أعلى معدل بقاء وبلغ 88.33%، بينما سجلت الخلايا المغلفة بطبقة واحدة معدل بقاء 82.51%، ثم تلتها الخلايا المكبسلة غيرمغلفة، إذ بلغ معدل البقاء 73.57% وأظهرت الخلايا الحرة أنخفاض أكثر وضوحاً في معدل البقاء وبلغت 61.61% بعد فترة حضن ثلاث ساعات عند تركيز 0.3 من املاح الصفراء، إذ يمكن الاستدلال من النتائج أن هناك تباين في ثباتية المعزز الحيوي تجاه أملاح الصفراء قد يكون ناتجا عن أكثر من سبب يعود الى طبيعة ونوع وتركيب وتركيز المادة المستعملة التي يرافقها تغير في خواصها الوظيفية فضلاً عن نوع السلالة وأعدادها وفترة الحضن التي تحددها بعض الاختبارات التي تجري عليها.

فسر **Sahadeva *et al* . (2011)** أن ثباتية المعزز الحيوي على تحمل أملاح الصفراء يعزى الى فعالية Bile salt hydrolase (BSH) الذي يجعل المعزز الحيوي يتسم بصفة المقاومة تجاه الاملاح الصفراء، بينما أظهرت بعض السلالات غير قادرة على المقاومة ويرجع السبب عدم أمتلاكها BSH مما يجعلها تتصف بالحساسية تجاه الاملاح الصفراء، كما أثبتت الدراسات السابقة أن تباين ثباتية سلالات البكتريا *Lctobacillus* and *Bifidobacterium* تجاه تراكيز مختلفة من أملاح الذي يعود الى أمتلاك بعض السلالات انزيم Bile salt hydrolase الذي يؤدي دورا مهما في إزالة الاقتران أو يساعد في تحلل أملاح الصفراء المقترن مما ينتج عنه أحماض الصفراء الحرة وأحماض أمينية وهذة الألية تعمل على خفض الكولسترول **(Ayama *et al* ., 2014)**.



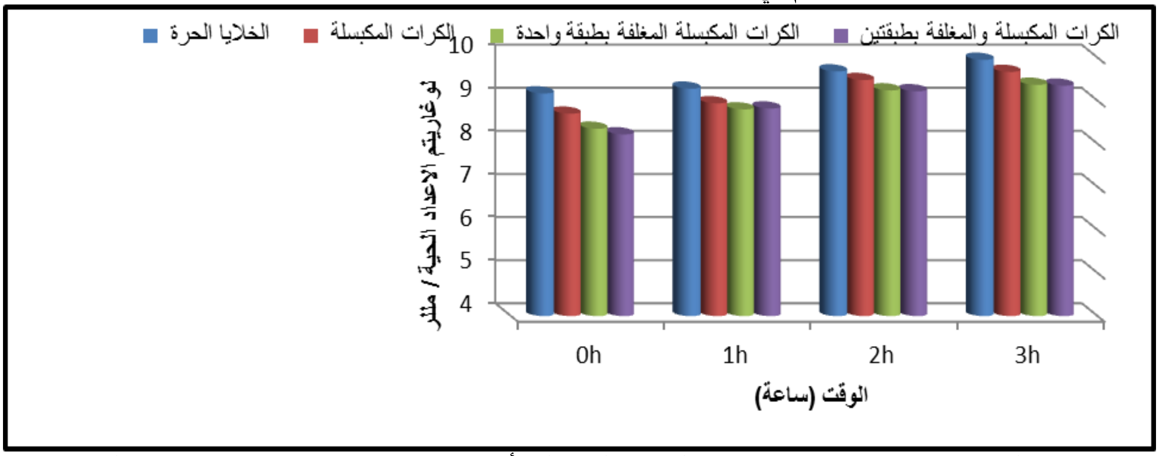
شكل (
و2 و3



جدول (

يوضح (الشكل، 4) و(الجدول، 3) التغير الحاصل في لوغاريتم الأعداد الحية/ مل ومعدل بقاء البكتريا من خلال دراسة ثباتية الخلايا *Lactobacillus casei* الحرة والمكبسلة بأنواعها تجاه تركيز 0.5 % من املاح الصفراء بعد 1 و2 و3 ساعة من الحضن، إذ أظهرت النتائج أن نسبة معدل بقاء البكتريا أبدى أنخفاضا تدريجيا وأن الخلايا الحرة أبدت أقل معدل بقاء وبلغت 53% مقارنة بالمكبسلة غير مغلفة والمغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين وسجل معدل بقاها 60.48 و77.96 و85% على التوالي بعد 3 ساعات، وقد يرجع السبب الى قلة ثباتية الخلايا الحرة تجاه الاملاح، ومن خلال ذلك يمكن الأستنتاج أن الكرات المغلفه بالكايتوسان توفر أفضل حماية مقارنة بالمغلفة بالالجينات ويرجع لعددة اسباب منها طبيعة تكوين البوليمر فالتغليف بالكايتوسان يتسم بأنتاج بوليمر معقد غير قابل للتحلل من قبل أملاح الصفراء وكذلك يساهم

في تحديد أنتشار أملاح الصفراء من والى الخلايا المكبلسة والمغلفة، فضلا عن ذلك أنخفاض المسامية porosity وسمك الطبقة، لذا فكل هذه الاسباب توفر أفضل حماية وكذلك يعمل الكايتوسان على إعاقة التفاعل مع أملاح الصفراء (Shu *et al*., 2018)، وكما بين **Mortazavian *et al*. (2007)** أن تباين في معدل أنطلاق البكتريا يرجع الى عوامل عدة منها تركيب البوليمر ودرجة مسامية فضلاً العوامل المتعلقة بالبكتريا والتي تضم كثافة الخلايا وطبيعة الانتشار من والى الخلية ومنع التداخلات بين البكتريا والبوليمر لكي لايؤثر على معدل أطلاق الخلايا وكذلك قرب الخلايا من سطح الكرات المكبسلة كلها هذه عوامل تساهم في تباين معدل بقاها.

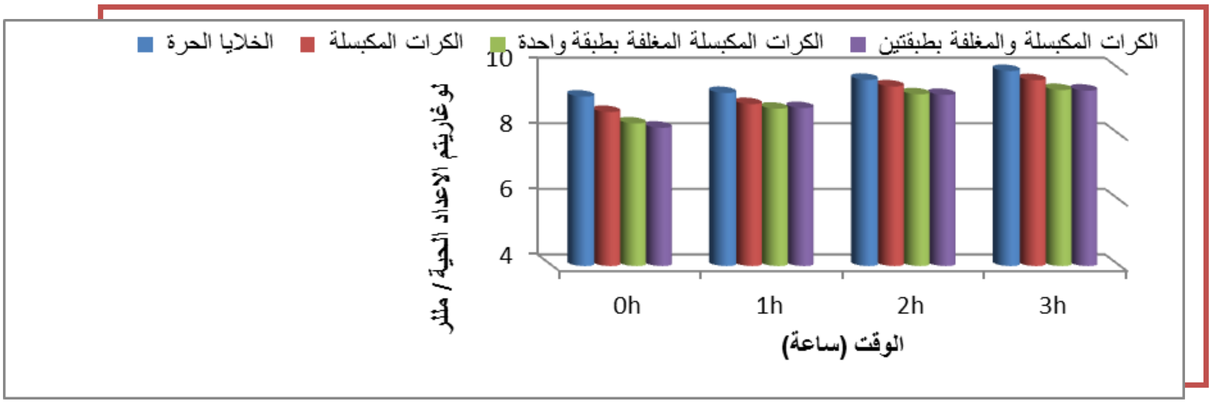


شكل (4): ثباتية الخلايا *Lactobacillus casei* الحرة والمكبسلة بأنواعها تجاه تراكيز 0.5% من املاح الصفراء بعد 1 و2 و3 ساعة من الحضن.

جدول (3): معدل بقاء الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة عند فترات مختلفة وبتركيز 0.5% أملاح الصفراء.

نوع الخلايا	معدل بقاء البكتريا (%)		
	ساعة	ساعتين	3ساعات
الخلايا الحرة	62	58.12	53
الكرات المكبسلة غير مغلفة	78.81	72.66	60.48
الكرات مغلفة بطبقة واحدة	89.23	82.51	77.96
الكرات مغلفة بطبقتين	92.34	88.69	85.0

يوضح (الشكل، 5) و(الجدول، 4) التغير الحاصل في لوغاريتم الأعداد الحية/ مللتر ومعدل البقاء للبكتريا من خلال دراسة ثباتية الخلايا *L. casei* الحرة والمكبسلة بأنواعه تجاه تركيز 0.7% من املاح الصفراء بعد الحضن لمدة 1 و2 و3 ساعة من الحضن وفيما ظهر الانخفاض أكثر وضوحا عند الخلايا الحرة فقد سجلت أعلى معدل اختزال 4.82 وأقل معدل بقاء 45.80% ثم تلتها الخلايا المكبسلة غير مغلفة بمعدل بقاء 58.65% وهذا يدل عدم تحمل الخلايا الحرة مقارنة مع المكبسلة غير مغلفة والمكبسلة المغلفة بانواعها، إذ أبدى معدل بقاء الخلايا بالزيادة تبعا الى نوع ومصدر مواد التغليف، وسجلت الخلايا المغلفة بطبقة واحدة معدل بقاء 77.24%، بينما تفوقت الخلايا المغلفة بطبقتين وسجلت أعلى معدل بقاء 82.62% تجاه املاح الصفراء طيلة فترة تعرضها للاملاح، ويعزى السبب في انخفاض الخلايا المكبسلة غير المغلفة الى سرعة تحلل البروتين وعدم مقاومتها الظروف القاسية كل من الحموضة والانزيمات واملاح الصفراء، ويفسر **Xing *et al*. (2015)** أن زيادة معدل بقاء البكتريا يعزى الى أختلاف في طبيعة مواد التغليف الذي يساهم في تكوين بوليمر يوفر أفضل حماية تجاه تراكيز املاح الصفراء.



شكل (5): ثباتية الخلايا *Lactobacillus casei* الحرة والمكبسلة بأنواعها تجاه تراكيز 0.7 من املاح الصفراء بعد 1 و2 و3 ساعة من الحضن.

جدول (4): معدل بقاء الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة عند فترات مختلفة وبتركيز 0.7 أملاح الصفراء.

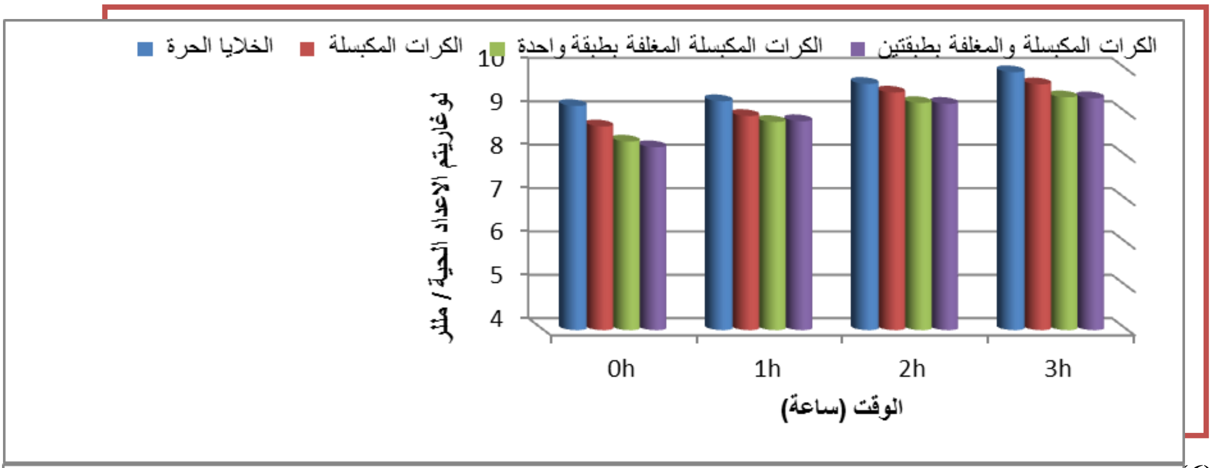
نوع الخلايا	معدل بقاء البكتريا %		
	ساعة	ساعتين	3ساعات
الخلايا الحرة	54	48.96	45.8
الكرات المكبسلة غير مغلفة	73.46	67.42	58.65
الكرات مغلفة بطبقة واحدة	86.29	81.43	77.24
الكرات مغلفة بطبقتين	89.91	85	82.62

جاءت النتائج مقاربة لما توصل إلية **Li *et al.* (2011)** عن دراسة تأثير معدل بقاء البكتريا *Lactobacillus casei* على التغليف بطبقات ومتكون من الالجينات والالجينات-الكايتوسان والالجينات-الكايتوسان-كاربوكسيل ميثيل سليلوزومعاملة مع MRS-Bile salt عند تراكيز 0.5 و1% ومدة حضن 0 و3 و6 ساعات، وأظهرت نتائج تغليف الكرات المغلفة بالطبقة الواحدة أن أعلى معدل بقاء لبكتريا الخلايا والكرات المغلفة بطبقتين (الالجينات-الكايتوسان-كاربوكسيل ميثيل الكايتوسان) بلغ 92.8-95.2% على التوالي عند ثلاث ساعات وبتركيز 0.5% املاح الصفراء، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل إليه **Chen *et al.* (2017b)** عند دراستهم تأثير أختلاف مواد التغليف على المعزز الحيوي *Bifidobacterium bifidum* BB01 وثباتية الخلايا تجاه أملاح الصفراء خلال زمن الصفر وساعة وساعتين، إذ أظهرت النتائج أن بقاء معدل البكتريا أبدى أنخفاضا تدريجيا مع وقت تعرضها ولم تسجل الخلايا الحرة والمكبسلة أي ثباتية بعد ساعتين، ويعود السبب في عدم ثباتية الخلايا الحرة والكرات المكبسلة والمغلفة بطبقة واحدة تجاه الاملاح الصفراء والظروف الحامضية، في حين أبدت كل من الخلايا المغلفة بطبقتين وثلاث طبقات ثباتية اتجاه الاملاح الصفراء عند تركيز 1% وقد بلغ لوغاريتم الاعداد الحية/ مللتر 5.88 و8.77 ونسبة معدل بقاء البكتريا 62 و94% على التوالي بعد ساعتين من الحضن.

ثباتية الخلايا البكتريا تجاه المعاملة الحرارية Stabilty of towards treatment heat of baceteria cell

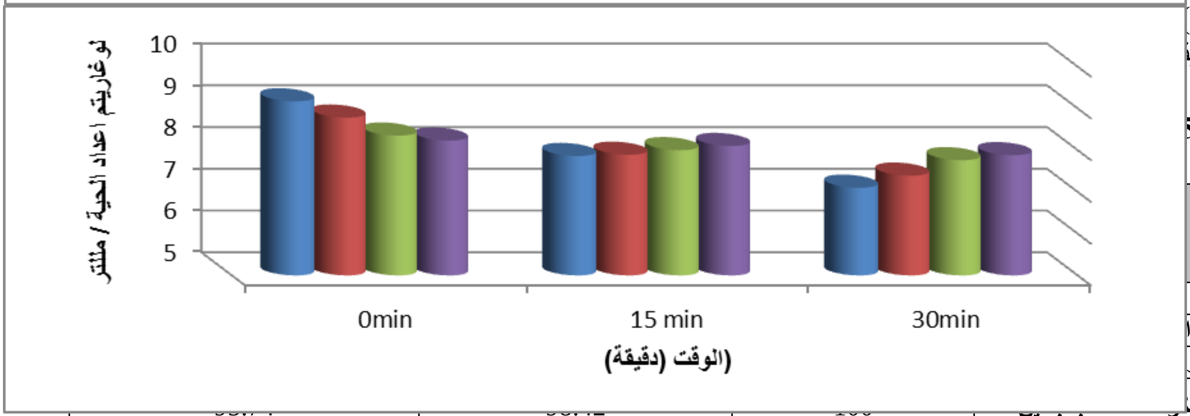
يوضح (الشكل، 6) و(الجدول، 5) تأثير المعاملة الحرارية على ثباتية خلايا المعزز الحيوي الحر وخلايا المكبسلة والمغلفة بأنواعها ومعدل بقاء البكتريا وتشير نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) في معدل بقاء البكتريا وثباتية الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة والمتمثلة بالمكبسلة غير المغلفة والمغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين، إذ يلاحظ أن أختزال أعداد الخلايا الحرة مقارنة مع المكبسلة والمغلفة عند درجة حرارة 45 م ولفترات زمنية مختلفة أظهرت تغيرات واضحة في هذه الدرجة الحرارية وقد سجلت الخلايا الحرة معدل بقاء 77.42%، بينما سجلت الخلايا المكبسلة والمغلفة معدل بقاء تراوح بين 84.16-95.74% عند 30 دقيقة على درجة حرارة 45م، وقد يعزى أنخفاض نشاط المعزز الحيوي في كلا الحالتين سواء بالمعاملة حرارية اوعند الخزن في التبريد، فأن تأثير المعاملة الحرارية من أهم العوامل المؤثرة على بكتريا حامض اللاكتيك وخصوصا الخلايا الحرة عند تعرضها الى درجة حرارة والتي تكون أكثر حساسة تجاه

الصدمة الحرارية المباشرة وتفقد فعاليتها كلما زاد تعرضها الى الدرجات الحرارية العالية مقارنة بالمكبسلة **(Ding & Shah,2008)**.



شكل (6

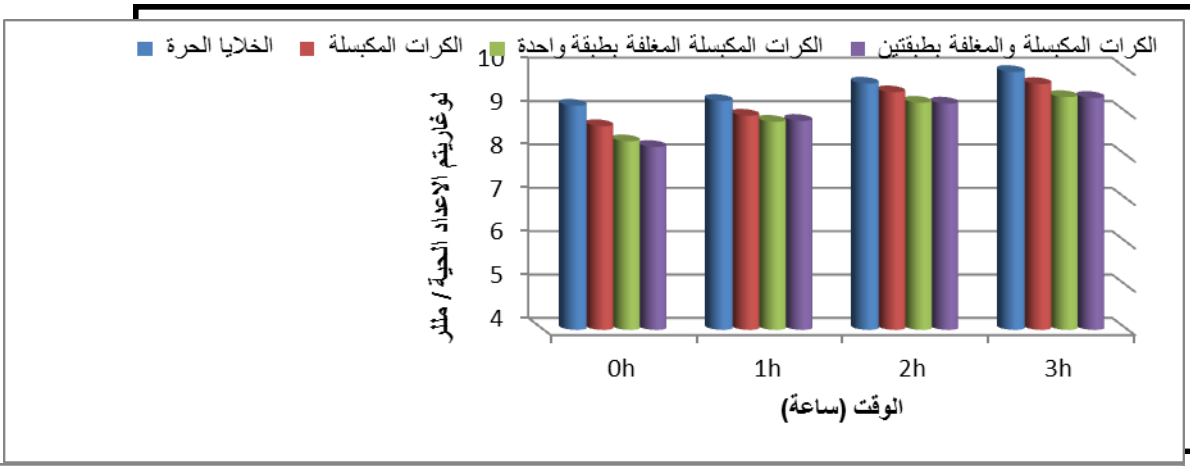
و 30 دقيقة

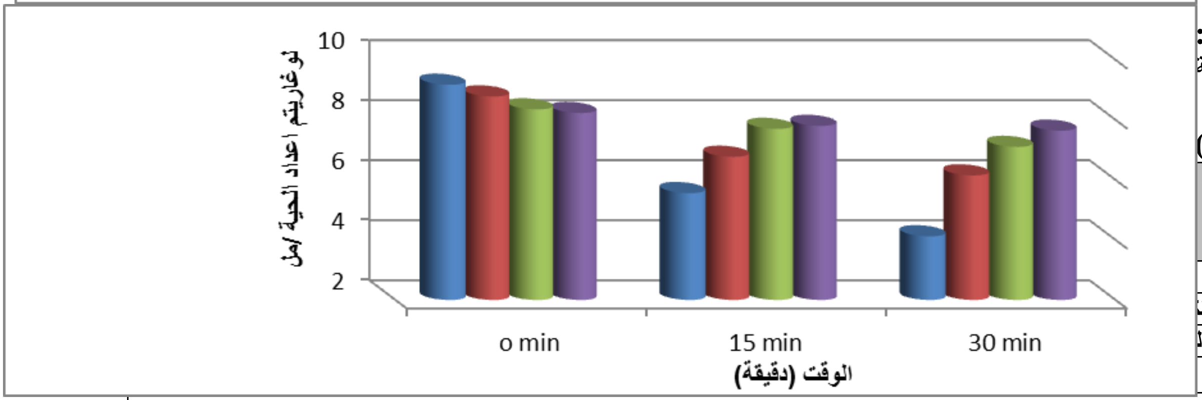


جدول (5

			الكرا
			الكر
			ال
لنوع × الزمن RLSD:1.946		لزمن RLSD:0.8575	لنوع R.LSD: 1.1065

يشير (الشكل، 7) و(الجدول، 6) الى انخفاض أعداد الخلايا الحرة مقارنة مع المكبسلة والمغلفة عند درجة حرارة 55م ولفترات زمنية مختلفة، إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية (P ≤0.05) في معدل بقاء البكتريا وثباتية الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة والمتمثلة بالمكبسلة غير المغلفة والمغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين، إذ أظهرت النتائج الى تباين في معدل بقاء وأنخفاض أعداد الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة عند 30 دقيقة ،إذ يلاحظ أن الخلايا الحرة سجلت أعلى معدل أختزال 4.12 واقل معدل بقاء 44%، بينما الكرات المكبسلة غير مغلفة سجلت اقل أختزال من الخلايا الحرة وبلغ 2.13 وبمعدل بقاء 75.74% ثم تلتها الكرات المكبسلة المغلفة بطبقة واحدة وسجلت أقل اختزال 0.96 وبمعدل بقاء 85.05%، في حين سجلت الكرات المكبسلة المغلفة بطبقتين معدل أختزال طفيف جدا 0.59 وأعلى معدل بقاء 92.83%، ويلاحظ من النتائج المستحصلة أن هنالك أختلافات واضحة في أختزال أعداد البكتريا ومعدل بقاءها في كل أنواع من الكرات قيد الدراسة وان سبب هذا الاختلافات يعود الى طبيعة تركيب البوليمر في كل انواعه.



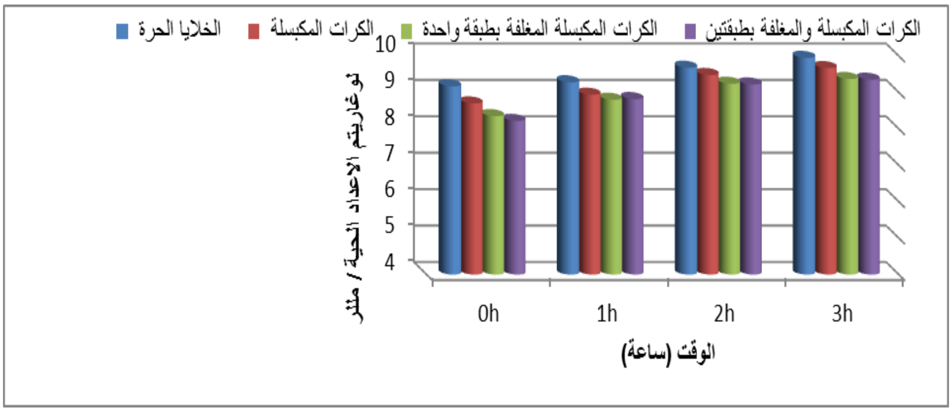


شكل (7):
و30 دقيقة

جدول (6)

ال		
ال		
RLSD: 1.0595 لنوع	RLSD: 0.8215 لزمن	RLSD:1.864 لنوع × الزمن

يشير (الشكل، 8) و(الجدول، 7) الى تأثير المعاملة الحرارية على الخلايا الحرة والمكبسلة والمغلفة ومعدل بقاء البكتريا عند درجة حرارة 65م، إذ أظهرت النتائج أن الخلايا المكبسلة والمغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين أتسمت بثباتيها تجاه الحرارة أفضل من الخلايا الحرة عند تعرضها لدرجة حرارة 65م لمدة 30 دقيقة، إذ أظهرت النتائج أن الكرات المكبسلة المغلفة بطبقتين سجلت أعلى نسبة بقاء البكتريا بواقع 86.87% وبأقل معدل أختزال كان 1.08 ثم تلتها المغلفة بطبقة واحدة ونسبة بقاء البكتريا بواقع 79.28% ومعدل أختزال 1.61، في حين سجلت الكرات المكبسلة غير المغلفة معدل أختزال 3.62 ومعدل بقاء 58.76% وسجلت الخلايا الحرة اقل معدل بقاء وبلغ 25.29% وأعلى أختزال 6.85.



شكل (8): تأثير المعاملة الحرارية على البكتريا الحرة والمكبسلة والمغلفة عند تعرضها لدرجة حرارة 65م بفترات زمنية 0 و15 و30 دقيقة.

جدول (7): معدل بقاء خلايا البكتريا عند درجة حرارة 65م.

نوع الخلايا	معدل بقاء البكتريا %		
	0 دقيقة	15دقيقة	30دقيقة
الخلايا الحرة	100	52.99	38.71
الكرات المكبسلة غير مغلفة	100	72.55	58.76
الكرات مغلفة بطبقة واحدة	100	88	79.28
الكرات مغلفة بطبقتين	100	90.76	86.87
RLSD:1.107 في النوع	RLSD:0.8575 لزمن	RLSD:1.946 النوع × الزمن	

جاءت هذه النتائج مقاربة الى ماتوصل الية **Mandal *et al*. (2006)** عند دراسة تأثير المعاملة الحرارية على اعداد خلايا بكتريا *Lactobacillus casei* NCDC-298 مع أختبار أفضل تركيز من الالجينات من خلال حساب اعداد البكتريا وقد سجل العدد اللوغاريتمي للخلايا المكبسلة 5.55 لوغارتم/ مللتر عند درجة حرارة 55م، بينما كان العدد اللوغاريتمي للخلايا المكبسلة 3.98 لوغارتم/ مللتر عند درجة حرارة 60م على التوالي خلال 20 دقيقة، إذ فسر ثباتية مقاومة الخلايا المكبسلة تجاه الحرارة مع زيادة تركيز الجينات الصوديوم الذي يعود الى قلة أنتشار الماء في تركيز 4% الجينات الصوديوم وزياده قطرالمسامات، كما كانت النتائج مع مقاربة ما توصل إلية **Uoled-Haddar *et al.* (2016)** الذي درس تأثير المعاملة الحرارية على تغليف المعزز الحيوي *Lactobacillus plantarm* عند درجة حرارة 25 و40 و50 و60م، وسجلت الخلايا المكبسلة أعلى معدل بقاء 90 و87 و67.94% على التوالي، في حين سجلت الخلايا الحرة معدل بقاء بواقع 40.5% عند درجة حرارة 60م، وأتفقت النتائج مع ما توصل إلية **Chen *et al*. (2017b)** عند دراستهم مقاومة الحرارة وتقدير معدل بقاء أنواع مختلفة من البادئات مع تباين طرق التغليف الدقيق ونوعين من الاغلفة ذات طبقة واحدة وطبقتين، إذ أظهرت النتائج أن حاصل عملية الربط بلغت 95% للكرات المكبسلة بطبقة واحدة وبمعدل بقاء 66.77%، بينما بلغت91% للكرات المكبسلة بطبقتين وبمعدل 72.65% في 30 دقيقة عند درجة حرارة 50م وقد يعزى هذا تباين الى نوع البادئ ونوع مواد التغليف ونوع الربط ونوع الطلاء االذي يؤدي دورا مهما في حجز الخلايا مما يساعد في تقليل معدل الاختزالها ورفع معدل بقاءها وبهذا تفوقت الكرات المغلفة بطبقتين على رغم من أنخفاض حاصل ربطها.

الاستنتاجات CONCLUSIONS

ان عملية التغليف الدقيق مع الطلاء تعمل على تحسين معدل بقاء المعزز وتوفر افضل حماية له وهذا يتاثر بعدة عوامل منها طبيعة المواد ونوع الغلاف التي تؤدي دورا مهما في المحافظة على اعداد المعزز الحيوي عند عرضه الى ظروف قاسية لتراكيز مختلفة من املاح الصفراء و المعاملات الحرارية خلال فترات زمنية مختلفة وتميزت الكرات المكبسلة غير المغلفة بأقل ثباتية تجاه املاح الصفراء، بينما سجلت الكرات المغلفة بطبقتين أفضل حماية للمعزز الحيوي بتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء والمعاملات الحرارية المختلفة.

References

i. Amine, C., Dreher, J., Helgason, T. & Tadros, T. (2014). Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocolloids*, 39, 180-186.

ii. Argin-Soysal, S., Kofinas, P. & Lo, Y. M. (2009). Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food hydrocolloids*, 23(1), 202-209.

iii. Arslan-Tontul, S. & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 160-169.

iv. Ayama, H., Sumpavapol, P. & Chanthachum, S. (2014). Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 36(3), 291-299.

v. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.

vi. Çabuk, B. (2014). *Development of Whey Protein Pullulan Microcapsules for The Encapsulation of Lactobacillus acidophilus NRRL-B 4495 as a Functional Food Ingredient*. Ph.D.Dissertation,The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, Turkey.145.

vii. Chen, H. Y., Li, X. Y., Liu, B. J. & Meng, X. H. (2017a). Microencapsulation of *Lactobacillu bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 29, 248-255.

viii. Chen, L., Yang, T., Song, Y., Shu, G. & Chen, H. (2017b). Effect of xanthan chitosan xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. *LWT-Food Science and Technology,* 81, 274-280.

ix. Ding, W. K. & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Nternational Food Research Journal*, 15(2), 219-32.

x. Feucht. A & Kwak, H. (2013). Microencapsulation of lactic acid cacteria (LAB). *Korean Journal Food Science Animal*, 33(2), 229-238.

xi. Ivanovska, T. P., Mladenovska, K., Kavrakovski, Z., Bogdanovska, L., Grozdanov, A., Popovski, E. & Petrushevska-Tozi, L. (2012). Effect of prebiotic content on functional and physicochemical properties of *Lactobacillus casei* loaded chitosan Ca alginate microparticles. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 58(1,2), 45-52.

xii. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2004). The influence coating material on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal,* 14, 737-743.

xiii. Lazidis, A., Hancocks, R. D., Spyropoulos, F. M., Kreu, B. R. & Norton, B. T. (2016). Whey protein fluid gels for the stabilisation of foams. *Food Hydrocolloids*, 53, 209-217.

xiv. Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J. & Cha, D. S. (2011). Preparation of alginate chitosan carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479-1485.

xv. 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.

xvi. Mathews, S. (2017). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate and gelatin and evaluation of its survival in simulated human gastro intestinal condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 6(4), 2080-2087.

xvii. Mortazovian, A., Rzavi, S. H., Ehsani, M. R. & Sohrabvandi, S. (2007). Principle and method of microencapsulation of probiotic. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-18.

xviii. Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. & Coppola,R.(2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology,* 23(2), 182-186.

xix. Ouled-haddar, H., Sifour, M., Idoui, T., Bouridane, H. & Arid, S. (2016). *Lactobacillus plantarum* G1 microencapsulation enhanced its viability during storage and gastrointestinal transit. *Sains Malaysiana,*45(7), 1049-1055.

xx. Parra-Huertas, R. A. (2010). Food microencapsulation: A review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.

xxi. Pitigraisorn, P., Srichaisupakit, K., Wongpadungkiat, N. & Wongsasulak, S. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist heatresistant multilayered microcapsules. *Journal of Food Engineering*, 192(1), 11-18.

xxii. Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V. & Chan, H. K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4), 1515-1522.

xxiii. Shu, G., He, Y., Chen, L., Song, Y., Cao, J. & Chen, H. (2018). Effect of xanthan chitosan microencapsulation on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in simulated gastrointestinal fluid and dairy beverage. *Polymers*, 10(6), 1-11.

xxiv. Siamand, R., Deeth, H. C. & Al-Saadi, J. M. (2014). Textural and sensory properties of a calcium induced milk gel. *Journal of Food Engineering,* 139, 10-12 .

xxv. Sung, M. R., Xiao, H., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2015). Fabrication, characterization and properties of filled hydrogel particles formed by the emulsion template method. *Journal Food Engeering,* 155, 16-21.

xxvi. Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J. R., Sabour, P. M. & Wang, Q. (2013). Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research International*, 52, 460-466.

xxvii. Tripathi, M. K. & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods,* 9, 225-241.

xxviii. Vivek, K. B. (2013). Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences,* 3(1), 188-199.

xxix. Xing, Y., Xu, Q., Lu, J., Cao, D., Li, H., Che, Z., Ma, Y., Li. X. & Cai, Y. (2014). Effect of different coating materials on the biological characteristics and stability of microencapsulated *Lactobcillus acidophilus*. *Journal RSC Advance,* 5(29), 22825-22837.

xxx. Zapata, A. & Ramirez-Arcos, S. (2015). A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Current Microbiology*, 70(6), 907-909.

xxxi. Zuidam, N. J. & Nedovic, V. A. (2010). *Encapsulation Technologies For Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer.New Yerk USA. p391.