دراسة تأثير التغليف الدقيق للمعززات الحيوية في زيادة عيوشيتها اتجاه الظروف الحامضية المتطرفة

عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر مصطفى عامر البياتي

الملخص

تم تغليف بكتريا ***Lactobacillus Plantarum*** و ***Lactobacillus rhamnosus GG*** بأستعمال 3% من جينات الصوديوم بتقنية البثق، وتم تغليف المعززات الحيوية المغلفة بجينات الصوديوم الناتجة وبطبقة ثانية باستخدام1% كايتوسان لتعزيز عيوشية المعززات الحيوية، وتم تقدير مقاومة الظروف الحامضية المتطرفة للأسين الهيدروجيني2و3 وبمدد زمنية تراوحت (60و120و180) دقيقة لبكتريا ***Lb. pla*** و ***Lb.GG*** لمعاملة السيطرة وللبكتريا المغلفة بطبقة واحدة وللبكتريا المغلفة بطبقتين ، وتشير النتائج الى أن المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين أبدت مقاومة أعلى من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة للمعاملات وللمدد الزمنية كافة ،إذ بلغت النسب المئوية للانخفاض لبكتريا ***Lb. pla*** و ***Lb.GG*** المغلفة بطبقتين عند أس هيدروجيني 3 تساوي 9.59% و 8.47% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي وبلغت النسبة المئوية للانخفاض عند رقم هيدروجين 2 تساوي 31.49% و 28.03% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي، وبلغت النسب المئوية للانخفاض لبكتريا ***Lb. pla*** و ***Lb.GG*** المغلفة بطبقة واحدة عند أس هيدروجيني 3 تساوي 21.96% و 17.66% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي وبلغت النسبة المئوية للانخفاض عند اس هيدروجيني 2 تساوي 49.91% و 37.35% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي بينما كان الانخفاض لمعاملة السيطرة واضحاً لبكتريا ***Lb. pla*** و ***Lb.GG*** عند المعاملات الحامضية المتطرفة جميعها وللمدة الزمنية كافة، إذ بلغت النسبة المئوية للانخفاض عند اس هيدروجيني 3 تساوي 41.97% و 38.28% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي وبلغت النسبة المئوية للانخفاض عند اس هيدروجيني 2 تساوي 80.23% و 71.97% كلاً على انفراد بعد مرور 180 دقيقة على التوالي.

المقدمة

تعرف المعززات الحيوية **Probiotics** وهي كلمة ذات أصل يوناني التي تعني " من أجل الحياة" بأنها كائنات حية مجهرية توفر فائدة صحية للكائن المضيف عند تناولها بكميات كافية (**8**). كما وعرفت من قبل **FAO/WHO** (**11**) بأنها الكائنات الحية المجهرية التي عند تناولها بأعداد كافية تعود بمنافع صحية للمضيف. من أهم أنواع المعززات الحيوية وأكثرها أستعمالا هما جنسان ***Bifidobacterium*** و***Lactobacillus*** وتشمل المعززات الحيوية أيضاً أنواع من ***Enterococcus*** و ***Lactococcus*** و ***Oenococcus*** و***Leuconostoc*** و ***Pediococcus*** و ***Streptococcus genera*** والموجودة المستوطنة في الجهاز الهضمي وأن لكل منها العديد من الفوائد التي تعود بمنافع صحية للمضيف وبشكل ملحوظ داخل الجهاز الهضمي (**24**) ، وهناك نوع واحد من الخمائر ذات المصدر البشري هي ***Saccharomyces boulardii*** (**6**). أن أهم فوائد المعززات الحيوية سواء أكانت سلالة مفردة أم مجموعة من السلالات هي تحسين مناعة جسم الإنسان عامة والجهاز الهضمي خاصة

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

لاسيما تحسين قوة الجدار المخاطي للأمعاء والعمل على تحقيق توازن النظام البيئي للنبيت المعوي في الجسم ولذلك لقدرتها على الالتصاق بجدار الطبقة المخاطية للأمعاء الذي يؤدي الى منع نمو الأحياء المرضية من الإستيطان في الأمعاء ومنافستها على المواد الغذائية (20). وأشار Kailasapathy (15) ان المعززات الحيوية تؤدي الفعل العلاجي عن طريق تحسين مناعة الجسم وخفض نسة الكولسترول الكلي وتحسن قابلية تحمل اللاكتوز والوقاية من بعض أنواع السرطان، ولا يقتصر عملها العلاجي للجهاز الهضمي حصراً بل تشمل أيضا الجهاز التنفسي والوقاية من الإصابة بالأمراض المعدية وخاصة الأطفال وغيرها من الفئات العمرية.

وللمعززات الحيوية فوائد صحية لجسم الأنسان عندما تكون بأعداد10^7 وحدة مكونة مستعمرة/مل وعند تناول المعززات الحيوية فأنها ستتأثر في ظروف الجهاز الهضمي لاسيما حموضة وإنزيمات المعدة التي يصل أسها الهيدروجيني الى 2 التي قتل أعداداً كثيرة من المعززات الحيوية وتصل الاعداد الى المستوى لا تعطي فوائد صحية لجسم الإنسان وأن تغليف دقيق المعززات الحيوية يعمل على حماية المعززات الحيوية من مواجهة الظروف القاسية للجهاز الهضمي ووصولها الى الأمعاء بالأعداد المطلوبة التي تعود بالمنافع الصحية لجسم الإنسان(19).

ان التغليف الدقيق هو عملية إحاطة مادة بمادة أخرى أو عملية إحاطة مادة مهمة بمادة أخرى أقل أهمية بحيث لا يتجاوز حجمها بضعة مليمترات (2). وتعرف كذلك بأنها عملية إحاطة العامل الأساس بمادة الجدار أو المادة الواقية وعادة تسمى المادة المغلفة بالطلاء أو الغشاء أو المادة الناقلة أو النسيج، ومن الأمثلة للمواد التي يتم تغليفها على مستوى علوم الأغذية هي النكهات والصبغات والمثبتات والمواد المستحلبة ومضادات اكسدة الإنزيمات والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية والمعززات الحيوية (27). 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 وإطلاقها أو تحررها في المواقع المناسبة (4).

وأستعملت عملية التغليف الدقيق قبل أكثر من 30 سنة لحماية بعض المركبات الأساس أو الخلايا البايولوجية من البيئة المحيطة بها التي قد تكون مدمرة لها ، وعلى العموم فأن عملية التغليف الدقيق تسمح للجزيئات للدخول أو الخروج من الكبسولة او الحبيبة ، مثل بيضة الطيور أو غلاف البذرة أو جدار السبور البكتيري أو الجلد و الصدف و غيرها(19).

وتوجد العديد من الفوائد التي يمكن تحقيقها 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 توفرها في المادة الغذائية . وكذلك توفير الحماية للمادة المراد تغليفها بالإضافة الى زيادة ثباتيتها إتجاه الرطوبة والأوكسجين والحوامض العضوية والحرارة وتفاعلها مع مكونات أخرى . وكذلك يمكن من خلال التغليف الدقيق التحكم في تحرير المادة المغلفة وإطلاق محتوياتها في المكان المطلوب. وتقليل النكهة والرائحة غير المرغوبة في الأغذية عن طريق تغليف المواد المكونة لها وزيادة تقبل المستهلك للمادة الغذائية . ان التغليف الدقيق للمواد يجعل المادة المغلفة صغيرة الحجم ومن السهولة التعامل معها وسهولة تداولها.

غلفت بكتريا حامض اللاكتيك لأول مرة من قبل العالم Berl Saddles عام 1975 باستخدام حبيبات الألجينات لغرض تخمر اليوغرت. وأستخدمت عملية التغليف الدقيق لحماية المعززات الحيوية من الظروف غير الملائمة من درجات حرارة و حموضة و العصارة المعوية و الأوكسجين وغيرها (5). وتُعدّ الألجينات من أكثر المواد استعمالاً في التغليف الدقيق كما تُعّد من المواد الآمنة صحياً والأكثر شيوعاً المعترف بها " GRAS" Generally Recognized as Safe والمعروفة بأنها تستعمل في التصنيع الغذائي وبشكل اَمن وموثقة ويتكون من سكريات متعددة يتم استخراجها من الأعشاب والطحالب البحرية (16)، ويُعّد الكايتوسان مكوثر موجب الشحنة قابل للتحلل

حيوياً له القابلية على تكوين هلام أيوني عن طريق إضافة أنيون، فضلاً عن ذلك يمكنه التفاعل مع بوليمرات سالبة الشحنة مثل الألجينات وبالتالي تكون كتلة هلامية مقاومة للعديد من الظروف القاسية يحضر الكايتوسان من الكايتين وهو من المصادر المتجددة والطبيعية، الذي يُعّد ثاني أكبر مركباً عضوياً منتشراً في الطبيعة بعد السيليلوز ويشابه الأخير الكايتوسان من الناحية الكيميائية فيما عدا وجود مجموعة الهيدروكسيد على ذرة كاربون 2 - C للسيليلوز و N-acetyl النهائية الموجودة في ذرة الكاربون 2 - C للكايتين والأخير يختلف عن الكايتوسان بوجود مجموعة أمين على ذرة كاربون 2 – C (5).

المواد وطرق البحث

تنشيط البكتريا

نشطت بكتريا *Lb. plantarum* و *Lb. rhamnosus GG* (المجهزة من شركة Valio الأمريكية بشكل مغلفات) ،إذ أفرغ مغلف واحد من البكتريا كلاً على إنفراد في أنبوبة تحتوي 10 مل من الوسط الزرعي MRS السائل وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة وكررت عملية التنشيط ثلاث مرات . ثم نشطت البكتريا كلاً على انفراد في حليب الفرز المسترجع بنسبة 12% المعقم عن طريق نقل 1 مل من البكتريا المنشطة في وسط MRS السائل الى 9 مل من الحليب الفرز المعقم وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة وكررت عملية التنشيط في حليب الفرز ثلاث مرات.

تغليف المعززات الحيوية بطبقة أولى

غلفت المعززات الحيوية من بكتريا *Lb. pla* و *Lb. GG* تغليفاً دقيقاً بتقنية البثق بأستعمال 3% من محلول الألجينات المحضر بإذابة 3 غم في 100 مل من الماء المقطر وعقم بدرجة حرارة 121م و ضغط 15 باوند/أنج^2 لمدة 15 دقيقة، إذ تم مزج 80 مل من محلول التغليف مع 10مل من حليب فرز المسترجع بنسبة 12% معقم و 10 من المزرعة البكتيرية لبكتريا *Lb. pla* و *Lb. GG* كلاً على إفراد وخلطها لمدة 45 دقيقة على جهاز صفيح ساخن مع محرك مغناطيسي باستعمال محرك مغناطيسي، ثم يتم تقطير المزيج باستعمال سرنجه لتكوين الحبيبات بمحلول التصلب المكون من كلوريد الكالسيوم 0.2 مولر وكلوريد الصوديوم 0.05 مولر ثم يتم تحريك الحبيبات بمحلول التصلب لمدة 10 دقائق وتترك في محلول التصلب لمدة 12 ساعة وبعد انتهاء تصلب الحبيبات يتم غسل الحبيبات الناتجة بماء البيتون 0.1% للتخلص من آثار محلول التصلب ثم تحفظ بدرجة حرارة 4 م لإجراء الاختبارات فيما بعد (10).

تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية

غلفت الحبيبات الناتجة بمحلول 1% كايتوسان ذو مصدر حيواني المعقم بدرجة حرارة 121 م و بضغط 15 باوند/ أنج^2 لمدة 15 دقيقة بعد إذابة غرام واحد منه في 99 مل من الماء المقطر المضاف إليه 1 مل من حامض الخليك الثلجي لأذابه الكايتوسان ثم عدل رقم الهيدروجين لمحلول الكايتوسان الى 6 باستخدام قاعدة NaOH بتركيز1 مولر، إذ تم غمر 15 غرام من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة في 100 مل من محلول 1% الكايتوسان لمدة ساعة واحدة بعدها تمت إضافة 100مل من محلول كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.1 مولر لتعزيز ارتباط الطبقة الطبقة الأولى بالطبقة الثانية ثم يتم خلط المكونات لمدة 5 دقائق بعدها تترك الحبيبات لمدة ساعتين لاستقرار ثباتية الطبقة الثانية بعدها يتم غسل الحبيبات الناتجة بماء البيتون 0.1% للتخلص من آثار الكايتوسان ومحلول كلوريد الكالسيوم ثم تخزن بدرجة حرارة 4 م لإجراء الاختبارات فيما بعد (22).

حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة

تم حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة عن طريق إضافة غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة الى أنبوبة حاوية على محلول فوسفات الصوديوم برقم هيدروجين **pH=7±0.1** وبتركيز **0.2** مولر وخلطها على صفيح ساخن مع محرك باستعمال محرك مغناطيسي لمدة ساعة كاملة لضمان التحررالكامل للمعززات الحيوي ثم يتم عمل التخافيف العشرية اللازمة باستعمال ماء البيتون، ثم نقل **1** مل من التخافيف العشرية الى أطباق بتري بعدها صبت الأطباق بواسطة **MRS** الصلب وحضنت الأطباق لاهوائياً بدرجة حرارة **37** م لمدة **48** ساعة (**5**).

حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة ثانية

تم حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين عن طريق إضافة غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين الى أنبوبة حاوية على محلول سترات الصوديوم برقم هيدروجين **pH=6.3±0.1** وبتركيز **0.1** مولر وخلطها على صفيح ساخن مع محرك باستعمال محرك مغناطيسي لمدة ساعة كاملة لضمان التحرر الكامل للمعززات الحيوي ثم يتم عمل التخافيف العشرية اللازمة بأستعمال ماء البيتون ، ثم نقل **1** مل من التخافيف العشرية الى أطباق بتري بعدها صبت الأطباق بواسطة **MRS** الصلب وحضنت الأطباق لاهوائيا بدرجة حرارة **37**م لمدة **48** ساعة **(22)**.

أختبار مقاومة الحموضة

تـم اختبار مقاومة المعززات الحيوية لبكتريا ***Lb.pla*** و ***Lb.GG*** لمعاملة السيطرة والمغلفة بطبقة واحدة وبطبقتين كلا على انفراد للأسين الهيدروجيين المنخفضين **2** و **3** و للمدد (**60** و**120**و**180**)دقيقة و بدرجة حرارة **37** م باستعمال حامض الهيدروكلوريك المركز بنسبة **37%**، إذ تم نقل **1** مل من معاملة السيطرة وغرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين كلاً على إنفراد الى أنبوبة أختبار حاوية على **9** مل من حليب الفرز المعقم ثم يضاف حامض الهيدروكلوريك المركز الى الأنابيب لحين الوصول الى الأس الهيدروجيني المطلوب، وبعد انتهاء مدة الحضن يتم إحلال الأغلفة وتقدير الأعداد الحية بطريقة صب الأطباق القياسية **(10)**.

النتائج والمناقشة

تأثير عملية التغليف الدقيق في الأعداد الحية

يبين جدول**1** تأثير عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة من الألجينات والطبقة الثانية من الكايتوسان في الأعداد الحية لكل 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 كل من**10.69** و **11.31** دورة لوغاريتمية/غم على التوالي، وانخفضت أعدادها الحية بعد عملية التغليف الدقيق بالطبقة الثانية الى كل من **10.21** و **10.74** دورة لوغاريتمية/غم على التوالي وبلغت النسبة المئوية لانخفاض بكتريا ***Lb.pla*** المغلفة بطبقة واحدة **19.38%** المغلفة بطبقتين **23.01%** وبغلفت نسبة المئوية لانخفاض بكتريا ***Lb.GG*** والمغلفة بطبقة واحدة **14.44%** و المغلفة بطبقتين **18.75%**. تُبيَن النتائج أن عملية التغليف الدقيق للمعززات الحيوية بتقنية البثق أدت الى انخفاض أعداد بكتريا ***Lb.pla*** تقريباً ثلاث دورات لوغاريتمية وبكتريا ***Lb.GG*** تقريباً دورتين لوغاريتمية وهذه النتيجة تتفق مع **Rather** وجماعته (**21**) بانخفاض ثلاث دورات لوغاريتمية عند التغليف لبكتريا ***Lb. pla NCDC201*** و ***Lb. casei NCDC297*** بطبقتين من

جدول 1 :الأعداد الحية و قطر الحبيبات 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 الحبيبات المغلفة بطبقة واحدة (ملم)	قطر الحبيبات المغلفة بطبقة ثانية (ملم)
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

الألجينات. وقد يعود سبب أنخفاض أعداد المعززات الحيوية عند التغليف الدقيق ذلك الى استعمال المزرعة البكتيرية بنسبة 10% من المحاليل الكلية المستعملة في عملية التغليف الدقيق التي تؤدي الى إنخفاض الأعداد الحية بمقدار1 أو 2 أو 3 دورات لوغاريتمية/غم، وربما يعود ذلك الى حساسية أو عدم مقاومة المعززات الحيوية للتغليف الدقيق باستعمال تقنية البثق، و نوع المادة المستعملة، و تركيزها في التغليف الدقيق وحجم الحبيبة و احتمالية تأثير كلوريد الكالسيوم (عامل التصلب) في أعداد المعززات الحيوية فضلاً عن احتمالية تأثير سرعة المزج العالية في مادة التغليف مع المزرعة البكتيرية بسبب حساسيتها الى مواد التغليف أثناء عملية التغليف الدقيق في أعداد المعززات الحيوية، كذلك اختلاف قابلية تركيز، و انتشار أنواع المعززات الحيوية داخل الحبيبة عند حساب الأعداد الحية (21,7).وأشار Capozzi وجماعته (3) 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 مولر هي 80.98%.

حجم الحبيبات

يتَبينٌ من النتائج في جدول 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 التي تم قياسها باستعمال فيرنية دقيقة لكل من بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة2.31 ±0.1 ملم و2.17± 0.1 ملم والمغلفة بالطبقة الثانية 2.63±0.1 ملم و 2.44±0.1 ملم على التوالي.

وتبُين النتائج الى عدم وجود اختلافات كبيرة واضحة بين أحجام وأقطار الحبيبات المتكونة بين بكتريا *Lb.pla* و*Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة نتيجة استعمال الظروف والمكونات المستعملة نفسها في عملية التغليف الدقيق بتقنية البثق لكلا البكتريا، وأن الأقطار التي حصلنا عليها عند تغليف المعززات الحيوية بتقنية البثق مقارب من القطر الذي حصل عليه García-Ceja وجماعته(13)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 ملم و 2.08 ملم على التوالي اعتماداً على نوع وتركيز المادة المستعملة في عملية التغليف الدقيق. وأشار Mortazavien وجماعته(18) أن معظم أقطار حبيبات المعززات الحيوية المتكونة بطريقة البثق تكون من 3–2 ملم، وأن قطر الحبيبات المتكونة بعملية البثق يعتمد على قطر فوهة المحقنة المستعملة في عملية تقطير محلول التغليف الى محلول التصلب، أيضاً يؤدي نوع و تركيز الألجينات و لزوجة المحلول تؤدي عملاً مهماً في حجم الحبيبات الناتجة ،إذ كلما قل تركيز الجينات الصوديوم صغر قطر الحبيبات المتكونة.كذلك الأحجام والأقطار التي حصلنا عليها عند تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية مقاربة لما وجدته Talebzadeh وجماعته (22) 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 التي تزيد من أحجام وأقطار المعززات الحيوية المغلفة بالطبقة

الثانية.إذ يعزى سبب الإرتباط 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 إزالة مجاميع الأسيتال التي تزيد من الشحنة الموجبة للكايتوسان، وبالتالي تزيد من فعاليته وقوة ارتباطه بالألجينات التي تكون ذات شحنات سالبة (1، 7)

مقاومة الحموضة

يبَين شكل 1 انخفاضا ملحوظاً في الأعداد الحية للمعززات الحيوية لمعاملة السيطرة عند رقم هيدروجين 3 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على انفراد ،إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.pla*** في معاملة السيطرة في وقت الصفر من 13.46 دورة لوغاريتمية/ مل قبل المعاملة الى 8.82 و 8.26 و 7.81 دورة لوغاريتمية/مل بعد60 و120 و180 دقيقة من المعاملة على التوالي بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض بالأعداد الحية المقدرة على أساس الدورات اللوغاريتمية الى 34.47% و 38.63% و 41.97% على التوالي، وانخفضت الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.GG*** في معاملة السيطرة من 13.27 دروة لوغاريتمية/مل قبل المعاملة الى 8.86 و8.42 و8.19 دورة لوغاريتمية/مل بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي وبلغت النسب المئوية للانخفاض 33.23% و 36.54% و38.28% على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة عند رقم الهيدروجين 3 بعد مرور بعد60 و 120 و 180 دقيقة ،إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.pla*** المغلفة بطبقة واحدة من 10.88 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 9.28 و 8.95 و 8.49 دورة لوغاريتمية /غم بعد60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض الى 14.71% و 17.74% و 21.96% على التوالي، أما بكتريا ***Lb.GG*** المغلفة بطبقة واحدة فقد انخفضت الأعداد الحية لها من 11.27 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 9.98 و 9.6 و9.23 دورة لوغاريتمية/غم بعد60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على انفراد من المعاملة بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض الى 11.5% و 14.36% و17.66% على التوالي، وتشير النتائج الى أن نسب الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة أقل من نسب الإنخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية للمعززات الحيوية في معاملة السيطرة عند رقم الهيدروجين 3 وبالمدد الزمنية نفسها 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على انفراد. وانخفضت الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين عند رقم هيدروجين 3 بعد مرور60 و 120 و 180 دقيقة ،إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.pla*** المغلفة بطبقتين من 10.32 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 9.69 و 9.47 و 9.33 دورة لوغاريتمية/غم بعد 60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض 6.1% و 8.24% 9.59% على التوالي بينما كان الانخفاض في الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.GG*** المغلفة بطبقتين من10.74 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 10.29 و 9.97 و 9.83 دورة لوغاريتمية/غم بعد 60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة وبلغت النسب المئوية للانخفاض الى 4.19% و 7.17% و 8.47% على التوالي، وتشير النتائج الى أن نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين أقل من نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة عند رقم الهيدروجين 3 وبالمدة الزمنية نفسها 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على انفراد.يبين شكل(2) أنخفاض واضح في أعداد للمعززات الحيوية عند تعرضها للظروف الحامضية عند رقم هيدروجين 2 و بفترات زمنية تراوحت 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على أنفراد، إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا ***Lb.pla*** في معاملة السيطرة من13.46 دورة لوغاريتمية/مل قبل المعاملة الى 4.57 و3.39 و2.66 دورة لوغاريتمية/مل بعد60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض بالأعداد

الحية الى 66.04% و 74.81% و 80.23% على التوالي بينما انخفضت الأعداد الحية لبكتريا *Lb.GG* في معاملة السيطرة من 13.27 دورة لوغاريتمية/مل قبل المعاملة الى 5.68 و 4.23 و 3.72 دورة لوغاريتمية/مل بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض بالأعداد الحية الى 57.19% و 68.12% و 71.97% على التوالي، بينما المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة 3% الجينات أعطت مقاومة أعلى بالمقارنة مع معاملة السيطرة عند التعرض للظروف الحامضية عند رقم هيدروجين 2 ،إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا *Lb.pla* المغلفة بطبقة واحدة من 10.88 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 7.09 و 6.16 و 5.45 دورة لوغاريتمية/غم بعد60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض 34.83% و43.38% 49.91% على التوالي بينما كان الانخفاض في الأعداد الحية لبكتريا *Lb.GG* المغلفة بطبقة واحدة من11.27 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 8.29 و7.83 و 7.06 دورة لوغاريتمية/غم بعد 60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة وبلغت النسب المئوية للانخفاض الى 26.44% و 30.52% و 37.35% على التوالي، وتشير النتائج الى أن نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة أقل من نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية في معاملة السيطرة عند رقم الهيدروجين 2 وبالمدد الزمنية نفسها 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على إنفراد، بينما المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين 3% ألجينات و 1% كايتوسان أعطت قدرة أعلى للمقاومة بمقارنتها مع معاملة السيطرة والمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة 3% الجينات عند الظروف الحامضية نفسها وبرقم هيدروجين 2 وبالمدد الزمنية نفسها 60 و120 و180 دقيقة على التوالي ،إذ انخفضت الأعداد الحية لبكتريا *Lb.pla* المغلفة بطبقتين من 10.32 دورة لوغاريتمية/غم قبل المعاملة الى 7.71 و 7.35 و 7.07 دورة لوغاريتمية/غم بعد60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة بينما بلغت النسب المئوية للانخفاض 25.29% و 28.78% 31.49% على التوالي بينما كان الانخفاض في الأعداد الحية لبكتريا *Lb.GG* المغلفة طبقتين من 10.74 دورة لوغاريتمية/غم قبل معاملة الى 8.19 و7.97 و 7.73 دورة لوغاريتمية/غم بعد 60 و120 و 180 دقيقة على التوالي من المعاملة وبلغت النسب المئوية للانخفاض الى 23.74% و 25.79% و 28.03% على التوالي، وتشير النتائج الى أن نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين أقل من نسب الانخفاض في الأعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة عند رقم الهيدروجين 2 وبالمدد الزمنية نفسها 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على انفراد.

أظهرت النتائج ان بكتريا *Lb.GG* كان لها أفضلية في مقاومة الظروف الحامضية عند الرقمين الهيدروجين 2 و3 من بكتريا *Lb.pla* سواء أكانت معاملة السيطرة أم مغلفة بطبقة واحدة أو بطبقتين عند مواجهة الظروف الحامضية سواء أكانت الخلايا حرة أم مغلفة بطبقة واحدة أم بطبقتين.

أشار كل منZhang و Cai (26) الى أن قابلية بعض المعززات الحيوية على البقاء على قيد الحياة بعد التعرض الى الظروف الحامضية المتطرفة و بلغت أعداد بكتريا *Lb.pla* و *Lb.GG* 7.81 و 8.19 دورة لوغاريتمية/مل عند اس هيدروجيني يساوي 3 بعد مرور 180 دقيقة و بأعداد 2.66 و 3.72 دورة لوغاريتمية/مل عند رقم هيدروجين يساوي 2 بعد مرور 180 دقيقة، بسبب قابليتها على استعمال آليات مختلفة من أجل البقاء على قيد الحياة، ومنها تنظيم أيض الأحماض الأمينية داخل الخلايا مثل نظام إزالة مجموعة الأمين للأرجنين، وهو النظام الأكثر استعمالاً عند مواجهة الظروف الحامضية ،إذ يتم تحويل الأرجنين الى أمونيا وغاز ثنائي أوكسيد الكاربون وطاقة فتستعمل الطاقة الناتجة في زيادة بروتونات السايتوبلازم الذي يؤدي الى ارتفاع رقم الهيدروجين في السايتوبلازم لموازنة حموضة البيئة المحيط بها. وكذلك قدرة جنس *Lactobacillus* الى تنظيم أيض الأحماض الأمينية المتفرعة مثل ليوسين وأيزوليوسين والفالين

لتنظيم توازن الحموضة عند مواجهة الظروف الحامضية ،إذ تعمل البكتريا على زيادة نشاط مجموعة من الإنزيمات (**IlvA, IlvC2, IlvD, and IlvE**) في تأييض هذه الأحماض الأمينية وإزالة مجموعة الأمين لها والحفاظ على درجة الحموضة داخل الخلية ، فضلاً عن إشتراك الإنزيمات بعملية أزالة مجموعة الكاربوكسيلية للحوامض الأمينية ولاسيما الهستدين لإنتاج الطاقة اللازمة لاستهلاك بروتون واحد وتوفير الحماية اتجاه الظروف الحامضية. وعلى الرغم من ذلك فإن نسبة عالية من أعداد المعززات الحيوية تفقد عيوشيتها، وهذا يبرر التوصية باستعمال أعداد عالية من المعززات الحيوية عند تناولها، وكذلك ينبغي أن تكون من مصدر بشري؛ لأنها تكون قد مرت بمثل هذه الظروف المتطرفة فضلاً عن قابليتها على الالتصاق في جدران الأمعاء **(23)** ، وأشار كل من **Zhang** و **Cai** (**26**) الى قدرة المعززات الحيوية على إنتاج الكلوتاثيون (عبارة عن ببتيد ثلاثي) الذي يعمل على توفير الحماية للمعززات الحيوية اتجاه الكثير من الظروف البيئية المتطرفة مثل الحموضة والانخفاض بدرجات الحرارة، ومقاومة درجات الحرارة العالية فضلاً عن الحماية ضد الأوكسجين، وتراكيز الأملاح العالية. أشار **Wu** وجماعته (**25**) الى قدرة بكتريا المعززات الحيوية،لا سيما ***Lactobacillus*** على تحوير تركيب جدارها الخلوي عند مواجهة الظروف الحامضية عن طريق زيادة نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة، و تغيير طول سلاسل الأحماض الدهنية، و تغيير سيولة الجدار الخلوي. أشاركل من **Fozo** و **Quivey** (**13**) الى أن إنتاج الحوامض الدهنية غير المشبعة يمكن أن يكون وسيلة محتملة لزيادة مقاومة الظروف الحامضية. وتم تحديد الجين **fabM** المسؤول عن إنتاج الإنزيم الذي يعمل على زيادة إنتاج الحوامض الدهنية الأحادية غير المشبعة أظهرت النتائج أن المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة أعطت مقاومة جيدة و بالعددين المطلوبين **8.49** و **9.23** دورة لوغاريتمية/غم لكل من بكتريا ***Lb.pla*** و ***Lb.GG*** عند أس هيدروجيني يساوي **3** بعد مرور **180** دقيقة و بلغتا**5.45**و **06**>7 دورة لوغاريتمية/غم لكل من بكتريا ***Lb.pla*** و ***Lb.GG*** عند أس هيدروجيني يساوي **2** بعد مرور **180** دقيقة عند أس هيدروجيني **2** بسب أن الألجينات وفرة الحماية اللازمة المعززات الحيوية عند مواجهة الظروف الحامضية القاسية وأن موت نسبة من خلايا المغلفة بالألجينات عند مواجهة الظروف الحامضية القاسية نتيجة تحلل الألجينات الى حامض مانورونيك وحامض لكولورونيك في البيئة الحامضية وتحرر بعض المعززات الحيوية وموتها **(9)**.

أن المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين **3%** الجينات و **1%** كايتوسان أظهرت مقاومة عالية إتجاه الظروف الحامضية المتطرفة، إذ بلغت أعدادها عند رقم هيدروجين **3** بعد مرور **180** دقيقة الى **9.33** و **9.83** دورة لوغاريتمية/غم وبلغت اعدادها عند رقم هيدروجين **2** بعد مرور **180** دقيقة الى **7.07** و **7.73**دورة لوغاريتمية/غم، بسبب ان الكايتوسان يعمل على تقليل حموضة المنتقلة الى الخلايا بسبب شحنات مجموعة الأمين الموجبة التي تؤدي الى الحد من تأثير الظروف الحامضية في عيوشية الخلايا **(14)**. بالإضافة الى أن نقطة ترسب الكايتوسان منخفضة بسبب أمتلاكه أربع مجاميع من **D**–الكلوكوز أمين. تؤدي الظروف الحامضية القاسية الى إضعاف أرتباط الكايتوسان بالألجينات الذي يؤدي الى إختراق الحامض لجدار الكايتوسان وتسبب بأضرار بالكبسولة وبالتي يؤدي الى أنخفاض الأعداد الحية **(17)**. وعلى العموم ان الغلاف الثاني وفر حماية أفضل للمعززات الحيوية مقارنة مع المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة و لنفس المدة الزمنية (**10**).

الاستنتاجات

1–إمكان تغليف المعززات الحيوية باستعمال الألجينات والكايتوسان بطبقة واحدة وبطبقتين.

2–ان المعززات الحيوية المغلفة تكون اكثر مقاومة للظروف الحامضة المتطرفة من الخلايا الحرة.

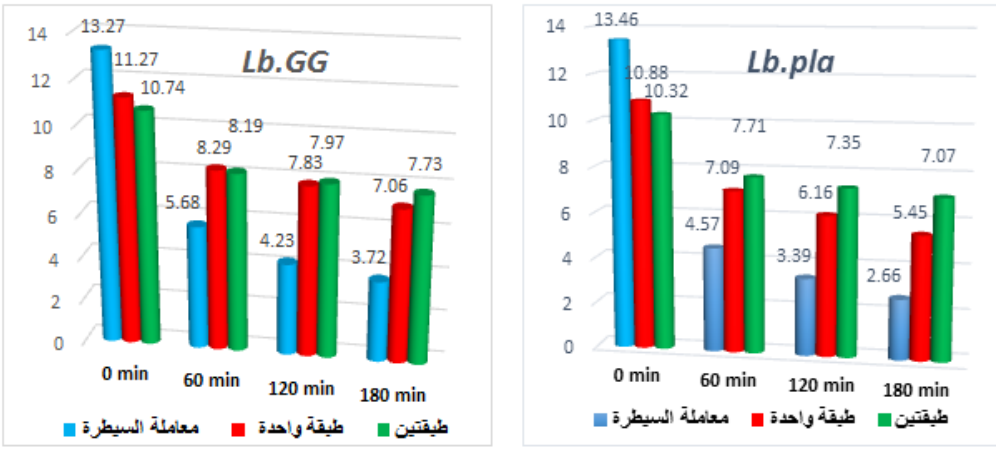
3-كانت استجابة تغليف بكتريا *Lb.GG* للتغليف الدقيق بطبقة واحدة وبطبقتين وفي مقاومة الظروف الحامضية المتطرفة أفضل من بكتريا *Lb.pla* .

التوصيات

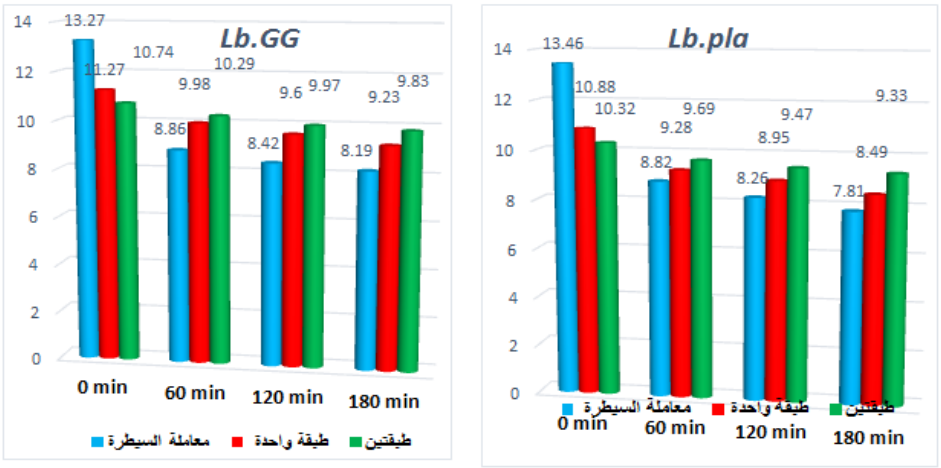
1-استعمال مواد طبيعية أخرى لاسيما المواد الكاربوهيدراتية مثل الصمغ العربي وصمغ الزانثان وغيرها من المواد البروتينية مثل بروتينات الحليب والجلاتين وغيرها ومواد أخرى لاسيما من السوابق الحيوية .

2-دراسة تأثير ظروف متطرفة أخرى مثل مقاومة التراكيز الملحية العالية ومقاومة الإنزيمات الهاضمة وغيرها.

3-دراسة تغليف المعززات الحيوية بأكثر من طبقتين.



شكل 1 مقاومة المعززات الحيوية لرقم الهيدروجين 3 لبكتريا كل من *Lb.pla* و *Lb.G*



شكل 2 : مقاومة المعززات الحيوية لرقم الهيدروجين 2 لبكتريا كل من *Lb.pla* و *Lb.GG* .

المصادر

1- خليفة، لؤي سلام خليفة (2015). إنتاج أغلفة سيليلوزية فعالة حيوياً واستعمالها في تغليف بعض منتجات اللحوم.رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

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

3- **Capozzi, V.; D. Fiocco; S. Weidmann; J. Guzzo. and G. Spano (2012). Increasing membrane protection in *Lactobacillus plantarum* cells overproducing small heat shock proteins. *Annals of Microbiology, 62*(2):517-522.**

4- **Champagne, C.P. and P. Fustier (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology, 18*(2):184-190.**

5- **Chávarri, M.; I. Marañón and M. C. Villarán (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In Probiotics. InTech.**

6- **Cheng, F. (2015). *Microencapsulation and viability of a probiotic in a simulated gastrointestinal environment* (Doctoral dissertation, University of Missouri--Columbia).**

7- **Corona-Hernandez, R.I.; E. Álvarez-Parrilla; J. Lizardi-Mendoza; A.R. Islas-Rubio; L. Rosa and A. Wall-Medrano(2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12*(6):614-628.**

8- **D'Orazio, G.; P. Di Gennaro; M. Boccarusso; I. Presti; G. Bizzaro; S. Giardina; A. Michelotti; M. Labra; and B. La Ferla(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.**

9- **Dianawati, D. (2014). *Survival of encapsulated probiotic bacteria during storage at low water activity at ambient temperature* (Doctoral dissertation, Victoria University).**

10- **Ding, W. K. and N. P. Shah (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science, 72*(9):126-134.**

11- **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.**

12- **Fozo, E. M. and R. G. Quivey (2004). The fabM gene product of Streptococcus mutans is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *Journal of Bacteriology, 186*(13):4152-4158.**

13- **García-Ceja, A.; E. Mani-López; E. Palou; and A. López-Malo (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.**

14– **Jiménez-Pranteda, M. L.; D. Poncelet; M. E. Náder-Macías; A. Arcos; M. Aguilera; M. Monteoliva-Sánchez; and A. Ramos-Cormenzana (2012). Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers.** ***Journal of Bioscience and Bioengineering, 113*****(2):179-184.**

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

16– **Kashima, K. and M. Imai (2012). Advanced membrane material from marine biological polymer and sensitive molecular-size recognition for promising separation technology. In** ***Advancing Desalination*****. InTech.**

17– **Krasaekoopt, W.; B. Bhandari; and H. C. Deeth (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage.** ***LWT-Food Science and Technology, 39*****(2):177-183.**

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

19– **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).**

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

21– **Rather, S. A.; R. Akhter; F. A. Masoodi; A. Gani; and S. M. Wani (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.**

22– **Talebzadeh, S.; A. Sharifan; B. G. Tarzi; and H. E. Panah (2014). Assessment the possibility of probiotic jelly production using microencapsulation technique of Lactobacillus acidophilus bacteria.** ***International Journal of Biosciences (IJB), 5*****(1):143-154.**

23– **Trip, H.; N. L. Mulder; and J. S. Lolkema (2012). Improved acid stress survival of Lactococcus lactis expressing the histidine decarboxylation pathway of S*treptococcus thermophilus CHCC1524*. *Journal of Biological Chemistry, 287*****(14):11195-11204.**

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

25– **Wu, C.; J. Zhang; W. Chen; M. Wang; G. Du; and J. Chen. (2012). A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in Lactobacillus casei Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance.** ***Applied Microbiology and Biotechnology, 93*****(2):707-722.**

26– **Zhang, H. and Y. Cai. (2014).** ***Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*****. Springer New York.**

27- Zuidam, N. J. and E. Shimoni (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer New York.

STUDY THE EFFECT OF MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC TO INCREASE SURVIVALITY TOWARDS EXTREME ACIDIC CONDITIONS

A. A. Al Shikh Daher M. A. Al Bayati

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 acid resistance conditions to pH 2 and 3 at 37°C for 60 , 120 and 180 min for control and bacteria coated one layer and bacteria coated two layer, The results indicate that the Probiotic coated two layer are more resistant to acid conditions than bacteria coated one layer for all treatments and all time periods , While the results of the control follow a significant reduction for viability of cell toward acid conditions.**

Part of M. Sc. Thesis for the second author.
College of Agric., Univ. of Baghdad, Bagdad, Iraq.