



التغليب الدقيق لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* بالمجفف تحت التفريغ ودراسة تأثيرها خارج و داخل الجسم الحي.

اطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة- جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية-

علوم الأغذية (تقنية حيائية)

من قبل الطالب

اسعد شامل عطية

ماجستير علوم زراعية- قسم علوم الاغذية

(2018)

بإشراف

أ.د. حيدر ابراهيم علي

2024م

أ.د. علاء كريم نعيمة

1446هـ



**"Microencapsulation of *Limosilactobacillus reuteri*
by Vacuum Drying Method and studying its effects
in vitro and vivo."**

A Dissertation

Submitted to the College of Agriculture/ University of Basrah As
partial Fulfilment of the Requirements for The Degree of Ph.D. in
Agriculture Sciences- Food Science (Biotechnology)

By

Asaad Shamil Atiya Al-Bahadli

M.Sc. in Food Science 2018

Prof. Dr. Alaa Kareem Niamah

Prof.Dr. Haider Ibrahim Ali

1446 A.H

2024 A.M

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ ۖ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الاسراء (85)

بسم الله الرحمن الرحيم

توصية الاستاذين المشرفين

اشهد بأن اعداد الاطروحة الموسومة (التغليف الدقيق لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* بالتجفيف تحت التفريغ ودراسة تأثيرها خارج وداخل الجسم الحي) المقدمة من قبل الطالب (اسعد شامل عطية) قد تمت تحت اشرافنا في جامعة البصرة / كلية الزراعة / قسم علوم الاغذية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الاغذية

التوقيع:

الاسم: د.علاء كريم نعيمة

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ: / / 2024

التوقيع:

الاسم: د.حيدر ابراهيم علي

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ: / / 2024

بناءً على التوصية المقدمة من قبل الاستاذين المشرفين احيل هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها....

توصية رئيس القسم

التوقيع:

الاسم: د. وائل علي سوادي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ: / / 2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

شكرًا وتقديرًا
٢٠١٦ - ١٤٣٨ هـ

الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على أشرف المرسلين، وخاتم النبيين، سيدنا محمد، وعلى آله وصحبه الطيبين الطاهرين.

الشكر والحمد لله الذي منحني القدرة على مواصلة دراستي، وإكمال جهدي المتواضع، لذا أجد نفسي ملزماً وأنا أنتهي من إعداد أطروحتي هذه بتقديم وافر الشكر والتقدير إلى جامعة البصرة وكلية الزراعة - قسم علوم الأغذية لاتحاثهم لي فرصة الدراسة ، كما اقدم الاحترام والعرفان بالجميل إلى المشرفين العزيزين كل من ا.د. علاء كريم نعيمة و ا.د. حيدر ابراهيم لرعايتهم ودعمهم لي وابدائهم الآراء والمقترحات السديدة. كما اوجه جزيل شكري وتقديري إلى المحلل الاحصائي لهذه الاطروحة (أ.م.د. ضرغام صبيح كريم و ا. د اسعد رحمان سعيد). كما اتقدم بالشكر والتقدير الى اعضاء لجنة المناقشة لتحمل عناء السفر وقبولهم مناقشة اطروحتي.

وأجد نفسي ملزماً بتقديم عرفان الجميل لكل من أسهم في إبداء رأي أو تقديم مشورة ولكل من أحيوا في قلبي نور علمهم.

والله ولي التوفيق

الإهداء

إلى من بعث رحمة للعالمين واستضاءت بنور هديه السماوات والأرض
إلى قنديل هذه الأمة الصادق الأمين نبي الرحمة محمد صلى الله عليه
وآله سلم.

إلى وطني الجريح موطن أولى الحضارات ومهبط الأنبياء وموطن
الصالحين العراق..... حفظه الله وأهله.

إلى جميع أرواح الشهداء التي سالت دماؤهم الطاهرة في سبيل هذا
البلد.

إلى عائلتي التي ساندتني ودعمتني بحبها ودعائها لي والدي
ووالدتي ادامهم الله لي

إلى من كانت عوناً وسنداً لي في الحياة ورفيقة دربي زوجتي
العزيزة

إلى سندي في الحياة أخوتي وأخواتي

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

أسعد شامل عطية

الخلاصة

استعملت عمليات التغليف الدقيق للمحافظة على عيوشية المعززات الحيوية من خلال مزج البكتريا النشطة مع مواد بروتينية وسكريات لحماية البكتريا من المؤثرات الخارجية. وتضمنت الدراسة فصل شرش حليب الجاموس بالطريقة الحامضية وتجفيفه بوساطة جهاز التجفيف بالرذاذ Spray drying وخلطه مع الصمغ العربي في تغليف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* باستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven تحت ضغط مخلخل قدره 50 ± 600 ملي بار ودرجة حرارة 5 ± 50 م بعدها قدرت صفات الغلاف باستعمال جهازالمجهر الالكتروني الماسح SEM-EDS و قدرت اعداد البكتريا قبل وبعد التجفيف ونسبة كفاءة عملية التغليف الدقيق وكمية انتاج المسحوق، بعدها طبقت التجربة المختبرية باختبار الغلاف تحت ظروف الجهاز الهضمي وقيم الاس الهيدروجيني (2.5 و 3 و 6 و 9) وتركيز 0.1 و 0.3 و 0.5% من املاح الصفراء، واخيرا درست صفة مقاومة الغلاف لدرجات الحرارة (45 و 63)م°.

تم انتاج لبن اغنام علاجي بإضافة البكتريا المغلفة بتركيز 1(T1) و 3(T2)% ومقارنته مع البكتريا الحرة (غير المغلفة T0) وعينة السيطرة (Tc). بعدها جرعت جردان المختبر باللبن المدعم بالبكتريا المغلفة و درست صفات الدم لمدة 60 يوم وتم وزن الكبد والكليتين والدراسة النسيجية لأمعاء مجاميع الجردان نهاية التجربة لمعرفة تأثير التغليف على مقاومة ظروف الجهاز الهضمي.

اظهرت النتائج ان لوغاريتم اعداد البكتريا بعد عملية التغليف بلغ 9.12 وحدة تكوين مستعمرة اغم، بينما كانت كفاءة عملية التغليف 77.68% وبنسبة رطوبة 4.26%، ونسبة كتلة مسحوق ناتج بلغت 83.58%. اظهرت صور تحليل المظهر الخارجي للغلاف المحيط ببكتريا *Limosilactobacillus reuteri* باستعمال المجهر الالكتروني (SEM-EDS) بجهد الكتروني مسلط قدره 15 كيلو فولت وبقوة تكبير 200 نانومتر ان قطر الغلاف المحيط بالبكتريا بلغ 68.29 نانومتر. ولم يظهر تأثير لمدة الخزن على اعداد البكتريا وكفاءة التغليف عند درجة حرارة 4 م و 25 م خلال 6 أشهر.

اضيفت بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* المغلفة الى اللبن الرائب المصنع من حليب الاغنام والمخمر ببكتريا *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* اذ اظهرت النتائج تحسين الخواص الفيزيوكيميائية والميكروبية والحسية للبن المحتوي على البكتريا العلاجية المغلفة في المعاملة (T1) التي تحتوي بكتريا مغلفة بتركيز 1% والمعاملة (T2) التي تحتوي بكتريا مغلفة بتركيز 3% مقارنة مع المعاملة Tc التي تحتوي على بكتريا البادئ فقط والمعاملة T0 التي تحتوي على بكتريا حرة غير مغلفة وكان اعلى تقييم حسي للمعاملة T2 خلال فترة خزن استمرت 21 يوم على درجة حرارة 4 م.

وتراوحت قيم الاس الهيدروجيني بين 4.51-5.61 في اليوم الأول من الخزن، بينما كانت تراوحت نسبة الحموضة الكلية بين 0.84-0.98% وكانت قابلية ربط الماء WHC في عينة Tc 43.31% وارتفعت في عينة T2 لتبلغ 58.40%، في حين انخفضت نسبة نضوح الشرش في العينات T1 و T2 مقارنة بالعينات Tc و T0 بعد 21 يوم من الخزن، وكانت نسبة الخفض في بكتريا حامض اللاكتيك 1.72، 1.86، 18.21، 20.50% لعينات Tc، T1، T0، T2 على التوالي، اما نسبة الخفض في بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* فقد بلغت 0.98، 1.00، 26.76% لعينات T2، T1، T0 على التوالي.

لوحظ حصول زيادة نسبية في وزن جردان المختبر في المعاملات Tf و T1 و T3، حيث بلغ متوسط الوزن (148 و 117.83 و 139.76) غم على التوالي، مقارنة مع Tc التي بلغت 163 غم في الاسبوع الاخير من التجربة. كما ظهرت زيادة طفيفة في اوزان الكبد والكليتين، اذ بلغ متوسط وزن الكليتين والكبد 1.74 و 7.126 غم لمعاملة T1، في حين بلغ 1.677 و 7.022 غم للمعاملة T3 مقارنة مع 1.727 و 6.941 غم في Tc على التوالي.

وبينت النتائج تفوق مجموعة الجردان في المعاملة T3 عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) في كل من كريات الدم البيض والحمر والهيموكلوبين، وبلغ اعلى تركيز لها ($10^9 \times 11.7$) خلية امل و ($10^{12} \times 7.56$) خلية امل

و13.6 غم/ديسلتر) على التوالي، مقارنة مع Tc التي بلغت (7.8 × 10⁹ خلية/امل و5.93 × 10¹² خلية/امل و11.9 غم/ديسلتر) بعد 60 يوم من التجريع على التوالي.

لوحظ انخفاض مستوى السكر في دم الجرذان التي جرعت البكتريا المغلفة وبلغ (0.286 و0.228995)

غم/ديسلتر في المعاملة T1 وT3 على التوالي، مقارنة مع (0.46185 و0.428605) غم/ديسلتر في Tc وTf

على التوالي. كما تفوقت البكتريا المغلفة عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) في خفض الكولسترول الكلي

والكولسترول منخفض الكثافة LDL والبروتين الدهني منخفض الكثافة VLDL والدهون الثلاثية ورفع مستوى

الكولسترول الجيد عالي الكثافة HDL في مصل دم الجرذان المختبرية طوال فترة التجربة بالمقارنة مع Tc

وTf. وبلغ اعلى نشاط 225.2 وحدة دولية/التر لأنزيم AST و66.34 وحدة دولية/التر لأنزيم ALT في Tc،

مقارنة مع (194.565 و180.45 و168.8) وحدة دولية/التر لإنزيم AST و(53.82 و51.505 و50.5) وحدة

دولية/التر لإنزيم ALT في المعاملة Tf والمعاملة T1 وT3 على التوالي.

كما تفوقت المعاملة T3 عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) في طول الزغابة وعمق الخبايا (القبو) اذ بلغ

طول الزغابيات 1912.61 بكسل (506.04 ملم) وعمق الخبايا 1218.61 بكسل (322.42 ملم) مقارنة مع

Tf وTc.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
أ	اية قرآنية	أ
ب	توصية الاستاذين المشرفين	ب
ت	شكر وتقدير	ت
ث	الاهداء	ث
ج	الخلاصة	ج
د	قائمة المحتويات	د
هـ	قائمة الجداول	ص
و	قائمة الاشكال	ض
ظ	قائمة المختصرات	ظ
1	المقدمة	1
5	مراجعة المصادر	2
5	خصائص المعززات الحيوية (Probiotics)	1-2
8	بكتريا <i>LimosiLactobacillus reuteri</i>	2-2
12	خصائص بكتريا <i>L.reuteri</i>	1-2-2
16	عملية التغليف Encapsulation	3-2
22	مواد تغليف خلايا المعززات الحيوية Encapsulating materials for probiotic cells	4-2
23	شرش الحليب Whey Milk	1-4-2
27	الصمغ العربي (Gam Arabic)	2-4-2
30	التغليف الدقيق لبكتريا <i>Lactobacillus reuteri</i>	5-2
33	جهاز التجفيف تحت الضغط (التفريغ) Vacuum drying	6-2
37	مبدأ عملية التجفيف بالضغط	1-6-2
37	ظروف عملية التجفيف بالضغط	2-6-2
39	مقاومة البكتريا المغلفة لظروف الجهاز الهضمي	7-2
42	تشخيص المظهر الخارجي للمعززات الحيوية المغلفة بتقنية المجهر الالكتروني (SEM)	8-2
43	تطبيقات المعززات الحيوية المغلفة	9-2
44	بكتريا المعززات الحيوية المغلفة في منتجات الالبان	1-9-2
45	بكتريا المعززات الحيوية المغلفة في منتجات اللحوم	2-9-2

46	استعمالات الاغلفة القابلة للاكل في تغليف المعززات الحيوية	3-9-2
49	المواد وطرائق العمل	3
49	Materials المواد	1-3
49	الاجهزة المستعملة في الدراسة	1-1-3
50	المواد الكيميائية والبكتريولوجية المستعملة في الدراسة	2-1-3
52	Culture media الأوساط الزرعية	3-1-3
52	Culture media تحضير الأوساط الزرعية	4-1-3
52	MRS Broth medium وسط التنشيط	1-4-1-3
53	MRS agar medium وسط التنمية	2-4-1-3
53	MacConkey agar medium	3-4-1-3
53	MRS-Tc agar medium	4-4-1-3
53	Mannitol Salt Agar medium	5-4-1-3
53	تحضير المحاليل المستعملة في الدراسة	5-1-3
53	Sodium (NaOH) محلول هيدروكسيد الصوديوم Hydroxide	1-5-1-3
54	تحضير محلول حامض الهيدروكلوريك	2-5-1-3
54	Phenolphthalein تحضير كاشف الفينولفتالين	3-5-1-3
54	Peptone water %0.1 تحضير ماء الببتون	4-5-1-3
54	Normal physiological saline تحضير محلول الملح الفسيولوجي solution	5-5-1-3
54	Phosphate Buffer Saline(PBS) محلول داري الفوسفات الملحي	6-5-1-3
55	Eosin Stain تحضير صبغة الأيوسين	7-5-1-3
55	tetracycline تحضير محلول	8-5-1-3

57	طرائق العمل Methods	2-3
57	مصدر الحليب	1-2-3
57	دراسة المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية للحليب	2-2-3
57	تقدير الحموضة الكلية % والاس الهيدروجيني.	3-2-3
57	تحضير شرش حليب الجاموس	4-2-3
58	تجفيف شرش حليب الجاموس	5-2-3
58	تنشيط بكتيريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	6-2-3
58	تحضير محلول التغليف	7-2-3
59	دراسة ظروف جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven	8-2-3
59	عملية التغليف.	9-2-3
60	دراسة صفات المسحوق المجفف	10-2-3
60	تقدير الرطوبة النسبية	1-10-2-3
61	تقدير العدد الكلي لبكتيريا القولون Total Coliform bacteria	2-10-2-3
61	دراسة التغير الحاصل في الأعداد الحية لبكتيريا <i>L.reuteri</i> المغلفة بعد التجفيف وخلال مدة الخزن.	3-10-2-3
61	تقدير كفاءة عملية التغليف و انتاجية المسحوق	4-10-2-3
62	تشخيص وتقدير كثافة العناصر المكونة للغلاف باستعمال تقنية (-SEM) (EDS)	5-10-2-3
63	التجربة المختبرية	11-2-3
63	تقدير مستعمرات بكتيريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> المغلفة في سوائل الجهاز الهضمي المختبري (الفم والمعدة والاثني عشري واللفانفي).	1-11-2-3
64	اختبار مقاومة البكتيريا المغلفة اتجاه املاح الصفراء	2-11-2-3
65	اختبار مقاومة البكتيريا المغلفة اتجاه التغير في الاس الهيدروجيني ودرجات الحرارة.	3-11-2-3
65	تدعيم اللبن الرائب باستعمال البكتيريا المغلفة	12-2-3
66	بكتيريا البادئ	1-12-2-3
66	طريقة تصنيع اللبن الرائب المدعم ببكتيريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> المغلفة	1-1-12-2-3
66	الاختبارات البكتريولوجية والفيزيوكيميائية والحسية للبن الرائب	2-12-2-3
66	حساب اعداد مستعمرات بكتيريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	1-2-12-2-3
67	حساب اعداد مستعمرات بكتيريا حامض اللاكتيك	2-2-12-2-3
67	حساب اعداد مستعمرات بكتيريا القولون	3-2-12-2-3

67	حساب اعداد مستعمرات بكتريا <i>Staphylococci</i>	4-2-12-2-3
67	تقدير قابلية ربط الماء (WHC) Water Holding Capacity	5-2-12-2-3
67	تقدير نضوح الشرش (STS) Susceptibility to Syneresis	6-2-12-2-3
68	تقدير الحموضة الكلية% و الاس الهيدروجيني.	7-2-12-2-3
68	الفحوصات الحسية Sensory tests	8-2-12-2-3
68	التجربة الحيوانية	13-2-3
69	ادارة حيوانات التجارب experimental animals	1-13-2-3
70	تصميم الدراسة	2-13-2-3
71	جمع العينات	3-13-2-3
71	عينات الدم	1-3-13-2-3
71	العينة المعوية	2-3-13-2-3
72	الخصائص المدروسة	4-13-2-3
72	سمات النمو	1-4-13-2-3
72	متوسط وزن الجسم (غم)	1-1-4-13-2-3
72	زيادة الوزن الاسبوعية(غم)	2-1-4-13-2-3
72	نسبة تحويل العلف(غم/غم)	3-1-4-13-2-3
72	دراسة التغيرات الحاصلة في أوزان الكبد والكليتين	4-1-4-13-2-3
72	الصفات الفسيولوجية	2-4-13-2-3
72	الخصائص الخلوية للدم	1-2-4-13-2-3
73	تقدير عدد خلايا الدم الحمراء (RBC) الكلي	1-1-2-4-13-2-3
73	تقدير عدد خلايا الدم البيضاء (WBC) الكلي	2-1-2-4-13-2-3
73	الاختبارات البايوكيميائية	3-4-13-2-3
73	تقدير تركيز الكلوكوز	1-3-4-13-2-3
74	تقدير نشاط انزيم AST	2-3-4-13-2-3
74	تقدير نشاط انزيم ALT	3-3-4-13-2-3
74	اختبارات الخصائص المعوية	4-4-13-2-3
74	الدراسة النسيجية	1-4-4-13-2-3
74	الفحص النسيجي	1-1-4-4-13-2-3
76	قياس طول الزغابة وعمق الخبايا	2-1-4-4-13-2-3
76	التحليل الاحصائي Statistical analysis	14-2-3
77	النتائج والمناقشة Results and discussion	4
77	المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية لحليب الجاموس والاغنام	1-4
78	تجفيف شرش حليب الجاموس باستعمال جهاز التجفيف بالرداذ	2- 4

79	تقدير العدد الكلي لبكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> قبل التجفيف	3- 4
80	محلول تغليف البكتريا العلاجية <i>L.reuteri</i>	4-4
81	الظروف المثلى لاستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven في تغليف بكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	5-4
82	صفات مسحوق البكتريا المغلفة	6-4
83	الاعداد الحية لبكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> المغلفة خلال مراحل الخزن.	7-4
85	تحليل المظهر الخارجي لغلاف البكتريا المجففة بتقنية (SEM-EDS)	8-4
92	التجربة المختبرية	9-4
92	دراسة اعداد بكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> المغلفة خلال مراحل الجهاز الهضمي المختبري	1-9-4
95	مقاومة املاح الصفراء	2-9-4
97	مقاومة الاس الهيروجيني	3-9-4
99	مقاومة درجات الحرارة	4-9-4
101	الصفات الكيميائية والخصائص الفيزيائية والمايكروبية والحسية لللبن الرائب المدعم بالبكتريا العلاجية المغلفة	10-4
101	الخواص الكيميائية و الفيزيائية لللبن الرائب	1-10-4
105	الاختبارات الميكروبية لللبن الرائب	2-10-4
108	الاختبارات الحسية لللبن الرائب	3-10-4
109	التجربة الحيوانية	11-4
109	الاختبارات المايكروبية	1-11-4
109	تقدير العدد الكلي لبكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> في براز حيوانات التجارب	1-1-11-4
111	الخصائص المدروسة	2-11-4
111	سمات النمو	1-2-11-4
111	متوسط وزن الجسم للجرذان (غم)	1-1-2-11-4
112	زيادة الوزن الاسبوعية للجرذان (غم)	2-1-2-11-4
113	وزن الكبد والكليتين للجرذان (غم)	3-1-2-11-4
113	الصفات الفسيولوجية	2-2-11-4
113	العد الكلي لخلايا الدم الحمراء والبيضاء والهيموكلوبين (RBC,WBC,HGB)	1-2-2-11-4
115	الاختبارات البايوكيميائية للجرذان المختبرية Biochemical tests	2-2-2-11-4
115	تركيز الكلوكوز	1-2-2-2-11-4
117	تركيز الدهون الكلي	2-2-2-2-11-4

120	تأثير البكتريا المغلفة والحررة على نشاط انزيمات الكبد AST, ALT	3-2-2-2-11-4
123	الخصائص المعوية	3-2-11-4
123	الدراسة النسيجية	1-3-2-11-4
123	قياس طول الزغابة و عمق الخبايا للجرذان	2-3-2-11-4
127	الاستنتاجات والتوصيات	5
127	الاستنتاجات	1-5
128	التوصيات	2-5
129	المصادر	6
129	المصادر العربية	1-6
130	المصادر الاجنبية	2-6
179	الملاحق	7
187	نتائج التحليل الاحصائي	1-7
194	نماذج مصورة للعمل طوال فترة الدراسة	2-7
197	Summary	8

قائمة الجداول

الصفحة	الجدول	التسلسل
15	لمحة عامة عن سلالات <i>L.reuteri</i> المبلغ عنها كمعززات حيوية.	1-2
35	نظرة عامة على الخصائص الرئيسية لتقنيات التجفيف المختلفة.	2-2
49	الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة	1-3
50	المواد الكيميائية والبكتريولوجية المستعملة في الدراسة	2-3
52	اهم الاوساط الزرعية الكيميائية المستعملة في الدراسة	3-3
60	نسب مواد التغليف لبكتريا <i>Limosil.reuteri</i>	4-3
68	استمارة التقييم الحسي	5-3
69	مكونات العليقة المستعملة في تغذية الجرذان	6-3
78	المحتوى الفيزيوكيميائي لحليب الجاموس والاعنام	1-4

81	لوغارتم اعداد بكتريا <i>Limosil.reuteri</i> والنسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف باستعمال نسب مختلفة من مكونات خليط التغليف.	2-4
82	الظروف المناسبة لتغليف بكتريا <i>Limosil.reuteri</i> باستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven	3-4
83	الصفات الكيميائية والميكروبية للمسحوق الجاف للبكتريا <i>Limosil.reuteri</i> المغلفة	4-4
84	لوغارتم اعداد البكتريا الحية والنسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف الدقيق لبكتريا <i>Limosil.reuteri</i> عند الخزن بدرجة حرارة 4 و 25 لمدة 6 اشهر.	5-4
91	التحليل الكيميائي بنظام EDS لمكونات الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس المجفف لغلاف بكتريا <i>Limosil.reuteri</i>	6-4
105	الخواص الكيميائية والفيزيائية لللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة وخلال فترات الخزن المختلفة	7-4
106	لوغارتم اعداد البكتريا في عينات اللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة وخلال فترات الخزن المختلفة	8-4
110	لوغارتم اعداد البكتريا <i>Limosil.reuteri</i> في براز حيوانات التجارب	9-4
113	متوسط اوزان الاعضاء الداخلية (الكبد والكليتين) لحيوانات التجارب اثناء فترة التجريع	10-4

قائمة الاشكال

الصفحات	الاشكال	ت
10	آليات عمل <i>L.reuteri</i> في القناة الهضمية (الامعاء الدقيقة والامعاء الغليظة)	1-2
18	مبدأ وعمل التغليف	2-2
19	دورة الكبسولة الدقيقة، من مرحلة التغليف الى مرورها بالجهاز الهضمي	3-2
21	عدد الابحاث المنشورة من 2010 إلى 2019 بشأن تطوير تقنيات التغليف الدقيق	4-2
28	التركيب البنائي للصمغ العربي	5-2
35	رسم تخطيطي لجهاز التجفيف بالتفريغ.	6-2
38	رسم تخطيطي لبعض اجهزة التجفيف المختلفة.	7-2

56	مخطط طرائق العمل المتبعة خلال فترة الدراسة	1-3
90	التحليل المظهر الخارجي للكبسولات الدقيقة باستخدام SEM-EDS	1-4
92	النسب المئوية لمكونات مزيج الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس المجفف لغلاف بكتريا <i>Limosilactobacillus reuteri</i> بنظام التحليل EDS.	2-4
95	كفاءة عملية التغليف لبكتريا <i>L.reuteri</i> المغلفة والحررة خلال مراحل الهضم المختبري.	3-4
96	النمو البكتيري لبكتريا <i>L.reuteri</i> بوجود تراكيز مختلفة لأملاح الصفراء .	4-4
99	تنمية بكتريا <i>L.reuteri</i> الحررة والمغلقة في قيم مختلفة من الاس الهيدروجيني.	5-4
101	كفاءة بكتريا <i>L.reuteri</i> الحررة والمغلقة بعد التعرض للمعاملة الحرارية.	6-4
107	نسبة الخفض في الاعداد الحية للبكتريا المتواجد في عينات اللبن الرائب خلال مدة الخزن المبرد، (A) بكتريا حامض اللاكتيك، (B) بكتريا <i>L.reuteri</i>	7-4
109	التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة وغير المغلفة	8-4
111	متوسط اوزان الجسم للحيوانات المختبرية خلال فترة تجريع 60 يوم.	9-4
115	تأثير بكتريا <i>L.reuteri</i> المغلفة والحررة على مصل دم حيوانات التجارب	10-4
120	تأثير بكتريا <i>L.reuteri</i> المغلفة وغير المغلفة على محتوى الدهون الكلية وانواعها في مصل دم حيوانات التجارب.	11-4
122	تأثير بكتريا <i>L.reuteri</i> المغلفة وغير المغلفة على نشاط انزيمات الكبد ALT و AST في حيوانات التجارب.	12-4
125	تأثير بكتريا <i>L.reuteri</i> المغلفة وغير المغلفة على طول الزغابة وعمق الخبايا في نهاية التجربة.	13-4
126	صورة مجهرية للاثني عشر (HandE stain. 100X)	14-4

قائمة المختصرات

المختصر	التسمية الكاملة
<i>L.reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
CFU/g or ml	وحدة تكوين مستعمرة/غم او مل
SEM-EDS	Scanning electron microscope-Energy-dispersive X-ray spectroscopy
RSM	reconstituted skim milk

Cps	cycle pulse second
MWM	mixed wall material comprising 2.5% (w/w) whey protein isolate/2.5% gum Arabic (w/w)/2.5% inulin (w/w)/2.5% sucrose (w/w)
BCWP	bovine colostrum Whey powder
Tg	Thermo Gravimetric
LPS	lipopolysaccharides
NCS	nano-crystalline starch
WPI	whey protein isolate
U/L	International unit/ liter
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HCT	Hematocrit
HGB	Hemoglobin
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCV	Mean Corpuscular Volume
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin
MONO	Monocyte
Lym	Lymphocyte
ALT	Alanine transaminase
ALS	Aspartate aminotransferase
PLT	Platelets
L.D.L	Low-Density Lipoprotein
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
H.D.L	High-Density Lipoprotein
MPV	Mediun Platelet Volume
HB	Hemoglobin
PCV	Platelet Cell Volume
RBC	Red Blood Cells
WBC	White Blood Cells
WHC	Water Holding Capacity

المقدمة

ان التركيز على الغذاء كمصدر للطاقة والمغذيات قد تغير في الآونة الأخيرة إلى توفير نظام معقد يمكن أن يعزز صحة الإنسان ورفاهيته. يشار إلى هذه الأنظمة باسم "الاجذية الوظيفية" functional "foods أو "المغذيات" "nutraceuticals". إن إحدى طرق إنتاج الاغذية الوظيفية هي تضمين بكتريا المعززات الحيوية القابلة للحياة في النظم الغذائية والتي يُزعم إن لها آثارًا مفيدة على صحة الإنسان كعلاج لأمراض الجهاز الهضمي. تعرف بكتريا المعززات الحيوية Probiotics بأنها كائنات حية دقيقة توفر فوائد صحية للمضيف عندما يأخذها الجسم بشكل كافٍ (Wong and Yu.,2023).

اشارت العديد من الدراسات للتأثيرات المفيدة لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* (*L.reuteri*) بما في ذلك الخصائص المضادة للبكتريا بسبب إنتاج المواد المضادة للميكروبات مثل الأحماض العضوية قصيرة السلسلة والإيثانول ومركب الريبوتيرين والتي تمكنها من منع وتثبيط الاحياء المجهرية المسببة للأمراض والتعفنات في الجهاز الهضمي للمضيف (Mu et al., 2018).

تعد *L.reuteri* من الأنواع غير المتجانسة اجباريا وتستوطن في الجهاز الهضمي للحيوانات من ذوات الدم الحار (Zimmermann et al.,2024). استعملت السلالات التي تعود لبكتريا *L.reuteri* كبكتريا المعززات الحيوية لأكثر من عقدين من الزمن في العديد من الاغذية الوظيفية (Mu et al.,2018). يُعزى نشاط بكتريا المعززات الحيوية لأنواع *L.reuteri*، سواء في الجسم الحي أو خارج الجسم الحي، جزئيًا إلى قدرتها على إنتاج 3-هيدروكسي بروبيونالددهيد (3-HPA) ويُسمى أيضًا ريبوتيرين، هو عامل مضاد للميكروبات واسع النطاق يتم إنتاجه بواسطة *L.reuteri* أثناء التمثيل الايضي للكلسرين (Abuqwider et al.,2022).

تكون بكتريا المعززات الحيوية حساسة لدرجات الحرارة العالية وهذا ما يؤدي إلى خسارة هائلة لأعدادها أثناء عمليات التصنيع ويمثل مشكلة كبيرة لها لذا فإن تجفيفها يشكل تحديًا كبيرًا عند استعمالها للتطبيقات الصناعية. ليس فقط عمليات إنتاج الغذاء وظروف التخزين ولكن أيضًا الظروف الفيزيائية للجهاز الهضمي للإنسان بعد الاستعمال الفموي مما تؤثر بشكل كبير على بقاء خلايا الحية للبكتريا وبالتالي على فعاليتها (Misra et al,2021). لذلك يجب حمايتها بنظام يحافظ على حيوية الخلية بأعداد حية في نطاق 10^6 - 10^9 وحدة تكوين مستعمرة غم أو مل في الغذاء وهي الحد المسموح باستعمالها (Kim et al.,2017) ومن ثم يجب تطوير نظام توصيل فعال وكافي لحمايتها من عمليات التصنيع والتخزين وظروف الجهاز الهضمي التي يجب أن تمر من خلالها في الجسم الحي إلى الامعاء. في الوقت نفسه يجب أن تتحرر في الامعاء أو الموقع المستهدف للمضيف لغرض عمل تأثيرها المفيد على المضيف (Xie et al., 2023).

تعمل عملية التغليف Encapsulation على الحفاظ على المواد الحيوية النشطة في الأغذية أثناء المعاملة والتخزين. التغليف الدقيق هو عملية تنتج عن طريق حفظ المركب أو المادة الفعالة حيويًا ضمن نوع واحد أو أكثر من مواد التغليف (Ye et al.,2018). توفر عملية التغليف إطلاقًا متحكمًا للمركبات النشطة بمعدل محدد في ظل ظروف معينة وتحسن من توافرها الحيوي وتزيد من ثباتها وتطبيقها في الأنظمة المختلفة (Saifullah et al.,2019). يمكن استعمال التغليف الدقيق للتغلب على مشاكل عدم استقرار البكتريا سواء في المنتج أو في بيئة الجهاز الهضمي (Jan et al.,2024).

يحمي التغليف الدقيق الاحياء المجهرية من البيئة المحيطة بها أثناء المعاملة والتخزين وتوفر إمكانية الحفاظ على بكتريا المعززات الحيوية حية لفترة أطول (Frakolaki et al .,2021). يتمثل التحدي في تطوير تقنية تغليف قوية في اختيار المواد المناسبة من للاغذائية جنبًا إلى جنب مع العملية المناسبة التي توفر صلاحية مقبولة على التخزين طويل الأجل خاصة إذا تم تخزين الخلايا في درجة حرارة ورطوبة محيطة مرتفعة نسبيًا (Harel and Tang,2014).

يعد الصمغ العربي *Gum Arabic* سكر متعدد غير متبلور وغير سام وعديم الرائحة وعديم اللون والمذاق يستعمل عادة في تغليف الزيوت الأساسية ومركبات الرائحة ويقدم الصمغ العربي خصائص استحلاب ممتازة ويوفر تشتتاً جيداً والاحتفاظ بالزيوت/النكهات الأساسية في المستحلبات اثناء عملية التجفيف. على الرغم من إمكانياته الرائعة يفضل الباحثون استعمال خلائط الصمغ العربي مع مواد التغليف الأخرى للتقليل من تكلفتها العالية (Choudhury et al.,2021). أكد Jantzen et al.(2013) أن مسحوق شرش الحليب هو مادة تغليف واقية مناسبة للمعززات الحيوية، وهو ناتج عرضي من صناعة الجبن يتكون من اللاكتوز وبروتينات الشرش والمعادن في الحليب.

تعد تقنية التجفيف بالتفريغ او التجفيف بالضغط المتخلل Vacuum drying هو تقنية تجفيف منخفضة التكلفة ومناسبة للمنتجات الغذائية الحساسة للحرارة ،اذ يعمل على مبدأ تطبيق الضغط أثناء عملية التجفيف و يحدث تبخر الرطوبة في المادة الغذائية عند درجة حرارة منخفضة، وبالتالي يتبخر الماء الموجود في الطعام بشكل أسرع مقارنة بالتجفيف العادي بسبب انخفاض الضغط في غرفة التجفيف (Vivek et al.,2023).

ويسبب زيادة الوعي لدى الانسان بأهمية الاغذية الوظيفية واثارها الصحية قبال امراض العصر ونظراً للأهمية البالغة لايجاد افضل انواع المعززات الحيوية (probiotic) التي يمكن اضافتها الى الاغذية لتكسبها صفة الاغذية الوظيفية ، لذلك هدفت الدراسة الى تغليف بكتريا المعززات الحيوية سلالة *Limosilactobacllus reuteri* بمواد الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس ودراسة بعض خصائص الغلاف داخل وخارج الجسم الحي واستعماله في تدعيم اللبن الرائب كمنتج علاجي حيوي ومن خلال الخطوات التالية:

1. استخراج شرش حليب الجاموس وتجفيفه واستعماله مع الصمغ العربي كخليط لمحلول التغليف.
2. تحديد الظروف المثلى من اجل الحصول على أفضل ضغط ودرجة حرارة لتغليف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* باستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven.
3. دراسة الخواص الكيميائية والفيزيائية لغلاف البكتريا المكون من شرش حليب الجاموس والصمغ العربي باستعمال تقنية SEM-EDS .
4. دراسة تأثير ظروف الهضم المختبري واملاح الصفراء والتغير في الاس الهيدروجيني ودرجات الحرارة على البكتريا المغلفة.
5. استعمال المعزز الحيوي المغلف لانتاج لبن رائب. ودراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية والمايكروبية والحسية للبن الرائب المتخمر المضاف اليه نسب مختلفة من البكتريا العلاجية المغلفة.
6. دراسة تأثير اللبن الرائب المنتج على خصائص الجهاز الهضمي وصفات الدم الخلوية والكيموحيوية في دم حيوانات التجارب.

1-2 خصائص المعززات الحيوية (Probiotics)

وفقاً لأحدث تعريف للجمعية العلمية الدولية لبكتريا المعززات والمحفزات الحيوية (ISAPP) International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics، يتم تعريف بكتريا المعززات الحيوية (Probiotics) على أنها "الاحياء المجهرية التي عند تناولها بكميات كافية تمنح فائدة صحية للمضيف" (Hill et al.,2014). في حين أن فكرة استعمال البكتريا المعززات الحيوية لتحقيق فوائد صحية ليست جديدة، فقد زاد الاهتمام بها بشكل ملحوظ في السنوات الأخيرة (Islam,2016) قد يرجع ذلك جزئياً إلى زيادة مقاومة المضادات الحيوية خاصة في علاج أمراض الجهاز الهضمي، بالإضافة إلى زيادة رغبة المستهلك في تعزيز الصحة الطبيعية.

تعد المعززات الحيوية امنة بشكل عام ولها تاريخ طويل من الاستعمال في تعزيز الصحة اذ كان الناس في جميع أنحاء العالم يستهلكون الاغذية المخمرة الغنية بهذه البكتريا، فقد وجد Metchnikoff(1907) أن العمر الطويل للمزارعين البلغاريين يرتبط ارتباطاً وثيقاً باستهلاك الالبان المتخمرة المحتوية على بكتريا *Lactobacillus* وكشفت الدراسات الحديثة عن وجود أكثر من 170 نوعاً من *Lactobacillus* ذات وظائف مختلفة منها تحسين نظام المناعة والحفاظ عليه وإنتاج مواد مضادة للبكتيريا الضارة وتعزيز وظيفة الحاجز المخاطي للجهاز الهضمي (Gentile et al.,2018)، وثبت انها تحسن من حالات الحساسية والتهابات الجلد والامعاء والتهابات المهبل والمسالك البولية واضطرابات الجهاز الهضمي، فضلا عن تمتعها بفوائد غذائية وعلاجية كتحسين هضم اللاكتوز والسيطرة على بعض أنواع السرطان والتحكم في مستويات الكوليسترول (Martin et al.,2015; Markowiak and Slizewska., 2017).

من أكثر سلالات Probiotics شيوعًا هي الانواع العائدة لبكتريا *Lactobacillus* و *Streptococcus* و *Bifidobacterium*، ومن ضمنها والتي ثبت أن لها خصائص مفيدة هي بكتريا *Lactobacillus spp.*، *Bifidobacterium spp.*، *Propionibacterium spp.*، *Streptococcus spp.*، *Bacillus spp.*، *Enterococcus spp.* وبعض سلالات بكتريا القولون (Kechagia et al.,2013) ومع ذلك فقد استعملت الاحياء المجهرية الاخرى مثل الخمائر كسلالات Probiotics مثل خميرة *Saccharomyces boulardii* (Gu.,2022) في حين أن البكتيريا الميتة ومكوناتها أو المنتجات الثانوية للتخمير يمكن أن يكون لها أيضًا خصائص Prebiotics، كما إن تطوير تركيبات معينة كعمليات التغليف بهدف توصيل البكتيريا الحية للامعاء هو لغرض الوقاية من مرض التهاب الأمعاء وكذلك الأمراض الأخرى المرتبطة بالقولون (Ali and Itsaranuwat.,2023).

تكون سلالات (Probiotics) فعالة اذا امتلكت معايير محددة منها القدرة على البقاء في الجهاز الهضمي والمقاومة العالية لأحماض المعدة وعدم وجود أي مورثات مقاومة للمضادات الحيوية قابلة للنقل والقدرة على ممارسة فوائد صحية في الامعاء (Montalban-Arques et al., 2015). تعمل Probiotics على تعزيز صحة الجسم بعدة آليات متنوعة منها مقاومة البكتريا المرضية من خلال التنافس على الغذاء وزيادة النمو والبلعمة واستغلال مخلفات الخلايا الميتة لاستبعاد مسببات الامراض وإنتاج الحوامض العضوية والحوامض الدهنية قصيرة السلسلة وتنظيم العبور المعوي وزيادة تحسين فلورا الامعاء (Hill et al.,2014). يمكن لبعض سلالات البكتريا المعززات الحيوية تحسين عملية هضم الطعام عن طريق ايض املاح الصفراء أو استكمال وظائف الإنزيمات الهاضمة عند فقدانها او قلة فعاليتها وتركيزها في الوسط (Amara and Shibl.,2015).

تمتلك المعززات الحيوية فعالية عالية في التكاثر والنمو في الامعاء والقولون مما يعني أنها تستطيع من المرور عبر المريء والمعدة الحامضية والظروف القلوية للأمعاء الدقيقة حتى تكون فعالة. يجب أن يأخذ في الاعتبار ليس فقط بقاء الاحياء المجهرية باعداد مرتفعة طوال فترة تخزين الغذاء ولكن أيضا قدرتها على الالتصاق بالخلايا الظهارية للأمعاء. فضلا عن ممارسة تأثيرها الحيوي المفيد من خلال إنتاج المضادات الميكروبية او أي نشاط آخر مفيد للمضيف مثل تحفيز المناعة وإنتاج عوامل مضادة للكوليسترول والسرطان (Yadav and Jha.,2019).

يعد بقاء المعززات الحيوية في الاغذية التي تعمل كوسط حامل وحافظ لها ضروريا جدا، باستثناء المنتجات الصحية الطبيعية فإن منتجات الألبان والاعذية المخمرة هي المصادر الرئيسية للمعززات الحيوية في النظام الغذائي للإنسان. وان تفضيل المستهلك لها ساهم في التوسع في تنوع منتجاتها المتاحة في متاجر البيع في السنوات الأخيرة. أظهرت دراسات مختلفة أن الاحياء المجهرية تقل اعدادها في الاغذية مثل اللبن الرائب والحليب المخمر بسبب تعرضها لدرجات الحرارة والحموضة المرتفعة والخزن غير الجيد (Kim et al.,2006).

ان تصنف الاغذية المحتوية على خلايا المعززات الحيوية انتجت كأطعمة وظيفية مما يمنحها فوائد فسيولوجية تتجاوز التغذية الأساسية (Verma and Rout.,2022). عادة ما تكون الـ Probiotics المستعملة في إنتاج الغذاء متاحة كمزارع سلالات جافة مركزة مما يوفر سهولة التعامل والتخزين والشحن (Vesterlund et al.,2012). زيادة وعي المستهلك واهتمامه بالصحة والنشاط هو العامل الرئيسي الذي يدعم الاسواق العالمية للنمو السريع في أسواق الأغذية الوظيفية والمعززات الحيوية (Bigliardi and Galati.,2013).

كما ان مواد الـ Inulin و fructooligosaccharide و galacto-oligosaccharide هي مركبات المحفزات الحيوية والتي تعطي تأثيرا حيويا تآزريا عند استعمالها مع بكتريا المعززات الحيوية، فهي تزيد من قابلية نمو ومقاومة المعززات الحيوية في الجهاز الهضمي مثل مقاومة حموضة المعدة والتحلل الجزئي بأنزيمات المعدة والأمعاء، وان تحلل المحفزات الحيوية الى جزيئات تستعملها خلايا المعززات الحيوية كركيزة اساسية للغذاء والتخمير (Dias et al., 2015; Rajam and Anandharamakrishnan., 2015; al., 2018).

وجد (Madureira et al., 2011) ان استعمال بكتريا *Bifidobacterium Animalis* و *Lactobacillus casei* بتركيز (10^3 و 10^4 و 10^6 - 10^8) وحدة تكوين مستعمرة/غم كبادئ للجبن وتقييم نشاطها ضد البكتريا المسببة للتلف والأمراض المنقولة بالغذاء، كان لها تأثير تثبيطي يمكن أن يطيل العمر الافتراضي لأجبان الحليب ويجعلها أكثر أمانًا عن طريق تأخير أو منع نمو البكتيريا المسببة للتلف.

2-2 بكتريا *LimosiLactobacillus reuteri*

تعد الانواع العائدة لجنس *Lactobacillus spp.* من السلالات البكتيرية التي تقع ضمن المعززات الحيوية (Probiotics) والأكثر استعمالا على نطاق واسع ويمكن ان تتواجد في مجموعة كبيرة ومتنوعة من المنتجات الغذائية في جميع أنحاء العالم كمنتجات الحليب واللحوم والفواكه والخضروات، كما وصفت على أنها بكتيريا لها القدرة على تحمل العمليات التصنيعية في العديد من الصناعات ولها القدرة على البقاء حية خلال التخزين والإنتاج (Giraffa et al., 2010). يشتمل جنس *Lactobacillus* على مجموعة كبيرة من الانواع المتجانسة وغير متجانسة التخمر من البكتيريا اللاهوائية الاختيارية الموجبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات وسالبة لفحص الكتاليز والتي تشمل *L.acidophilus* ; *L.rhamnosus* ; *L.bulgaricus* ; و سلالة *L.reuteri* (Ünal and Erginkaya., 2010).

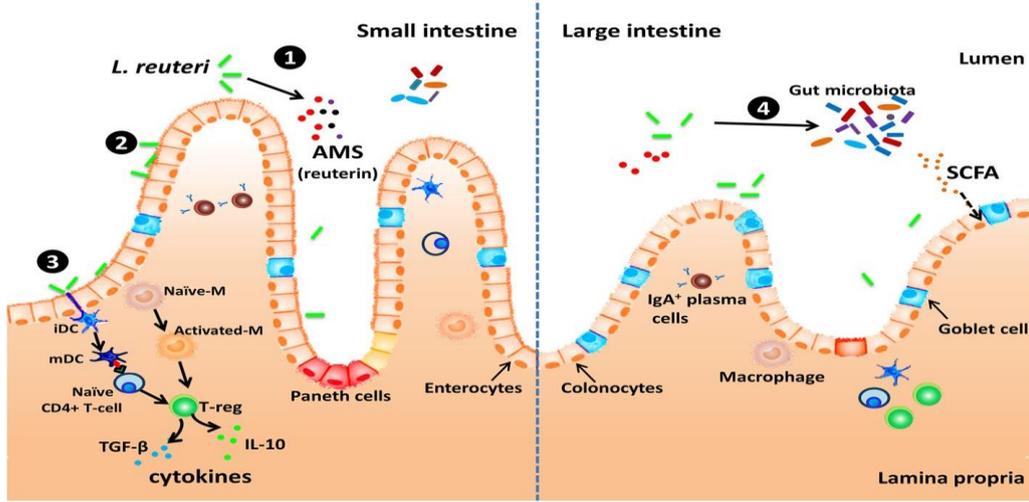
تتواجد سلالة *L.reuteri* ضمن الفلورا الطبيعية للجهاز الهضمي للإنسان والحيوان وكذلك في أماكن مختلفة مثل المسالك البولية والجلد وحليب الام والخنازير والدواجن والحيوانات الأخرى، وباعداد متفاوتة اعتماداً على النوع وعمر المضيف وطبيعة القناة الهضمية، ونظراً لكونها مستوطن جيد في الأمعاء فهي تظهر تأثيراً مضاداً لمسببات الأمراض فيها (Greppi et al., 2020; Mu et al.,2018). وتكون بشكل خلايا عصوية بأبعاد (0.7-1.0 في 2.0-0.5 µm) وتنمو بدرجة حرارة مثلى بين 15-45 م والأس الهيدروجيني الامثل لها بين 5.0-7.5 (Kandler et al.,1980).

ذكرت الدراسات العديد من التأثيرات المفيدة لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* بسبب إنتاجها للمواد المضادة مثل الأحماض العضوية قصيرة السلسلة والإيثانول والريوترين والتي تمكنها من تثبيط المستعمرات الميكروبية المسببة للأمراض وتحسين فلورا الامعاء. فضلا عن ذلك يمكنها أن تدعم الجهاز المناعي للمضيف عن طريق تقليل إنتاج السيتوكينات المسببة للالتهابات وتمنع الالتهاب عن طريق تثبيط الممرضات (Niamah et al.,2021; Niamah et al.,2023).

وجد (Mu et al.,2018) ان بكتريا *L.reuteri* تستوطن في مواقع مختلفة من جسم الانسان ويختلف عدد مستعمراتها من شخص الى اخر. وقد لوحظت العديد من الآثار المفيدة لها ومنها :

- 1- يمكنها إنتاج مركبات فعالة مضادة للميكروبات، مثل الأحماض العضوية والإيثانول والريوترين reuterin. ونظراً لنشاطها المضاد للميكروبات، فإنها قادرة على تثبيط مستعمرات الميكروبات المسببة للأمراض وإعادة تشكيل تركيبة الاحياء المجهرية المتواجدة في الامعاء.
- 2- يمكن أن تدعم بكتيريا *L.reuteri* الجهاز المناعي. من خلال تقليل إنتاج السيتوكينات المؤيدة للالتهابات و تعزيز تطور الخلايا التائية T- cells التنظيمية ووظيفتها.
- 3- تتنافس مستعمرات بكتريا *L.reuteri* مع الاحياء المجهرية في تجويف الامعاء وبالتالي تمنع من التصاقها في الانسجة وتدعم الحاجز المعوي. وأن الانتقال الميكروبي عبر غشاء بطانة الأمعاء هو

السبب الرئيسي للإصابة بالعديد من الالتهابات الموجودة في الأمعاء والأنسجة البعيدة. ولوحظ في السنوات الأخيرة أن زيادة حالات الإصابة بأمراض الالتهاب بسبب انخفاض أعداد مستعمرات *L.reuteri* لدى الإنسان (الشكل 1-2).



الشكل (1-2): آليات عمل *L.reuteri* في القناة الهضمية (الأمعاء الدقيقة والأمعاء الغليظة) Hou et al. (2015):

① يمكن أن تنتج *L.reuteri* مجموعة متنوعة من المواد المضادة للميكروبات (AMS) مثل حمض اللاكتيك و الريوتيرين reuterin (Martinez et al.,2009 ; Amin et al.,2013). ② *L.reuteri* لديه القدرة على التكاثر والنمو بشكل مستعمرات، ويمكن أن يلتصق بالميوسين والخلايا الظهارية المعوية Wang (et al.,2008 ; Li et al.,2008 ; Yu et al.,2007). ③ لقد ثبت أن *L.reuteri* يحفز أو يقمع الاستجابات المناعية الفطرية عن طريق تأثير إنتاج السيتوكينات في الخلايا البلعمية (M)، والخلايا الأحادية، والخلايا الجذعية (DC). لقد ثبت أن تعديل الخلايا الجذعية بواسطة *L.reuteri* يتم بواسطة جزيء الالتصاق بين الخلايا الخاص بالخلية الجذعية -3 (molecule-3-grabbing) الذي يمسك غير الإنتكرين (integrin DC-SIGN) ويعزز تطوير الخلايا التائية التنظيمية التي تنتج كميات عالية من الإنترلوكين-10 (interleukin-10(IL-10)) وتحويل عامل النمو (TGF-β) transforming growth factor-β (Walter et al.,2011 ; Liu et al.,2010). ④ ذكر ان *L.reuteri* تؤثر على مستعمرات بكتريا القولون وتركيز الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (SCFA) short chain fatty acid (Liu et al.,2014).

درست بكتريا *L.reuteri* DPC16 كاحدى السلالات العائدة لجنس *Limosilactobacillus* وتستعمل على نطاق واسع في العديد من الصناعات وبسبب خصائصها المميزة يتم اضافتها للاغذية الوظيفية فهي تمتلك نشاطا فعالا ضد بعض مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء، لإنتاجها المركب المضاد للميكروبات (β -3-hydroxypropionaldehyde) والمعروف باسم الريوترين (Reuterin) (Ohshima et al., 2016). اكدت الدراسات على أن سلالات *L.reuteri* تثبط نمو العديد من مسببات الأمراض المعوية مثل *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, rotavirus (Seo et al., 2010 ; Mukai et al., 2002).

تتميز بكتريا *L.reuteri* بكونها بكتريا غير متجانسة ذات تأثيرات متعددة على صحة المضيف مثل الوقاية وتحسين الاضطرابات المتنوعة، وتم عزلها لأول مرة في عام 1962م وهي تنمو في كميات قليلة من الأوكسجين وتستوطن الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان بشكل طبيعي (Kandler et al., 1980). يمكن لهذه البكتريا أن تتحمل مدى واسع من الأس الهيدروجيني، ويستعمل آليات مختلفة تسمح له بتنشيط الاحياء المجهرية المسببة للأمراض والملوثة للغذاء (Valeur et al., 2004).

في دراسة سابقة وجدت ان تناول $10^9 \times 209$ وحدة تكوين مستعمرة/يوم من بكتريا *L.reuteri* كانت جيدة وآمنة وفعالة لدى البالغين والأطفال والرضع وحتى لدى الاشخاص المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية من خلال تحسين المناعة لدى الاشخاص المصابين (Bošnjak., 2023).

تمتلك سلالات بكتريا *L.reuteri* العديد من الصفات التي تجعلها من ضمن المعززات الحيوية منها مقاومة الحرارة والاس الهيدروجيني وأملاح الصفراء بالإضافة إلى بقاء اعدادها ضمن المستوى المطلوب خلال التخزين ومنافسة البكتريا المسببة للأمراض (Huang et al., 2004). كما ان للبكتريا القدرة على الالتصاق بالميوسين والخلايا الظهارية المعوية والنمو والتكاثر فيها (Yi et al., 2018).

وجد ان سلالات *L.reuteri* قادرة على التخلص من الجذور الحرة في التجارب المختبرية (Wang et al.,2009)، وتقوم بتشفير العديد من الإنزيمات المضادة للأكسدة (Hou et al.,2015). أظهرت الدراسات التي أجريت على الانسان والحيوان أن تناول *L.reuteri* عن طريق الفم يقلل من حدوث وشدة الإسهال ويمنع المغص والتهاب الأمعاء والقولون ويحافظ على حاجز للامعاء (Dicksved et al.,2012).

1-2-2 خصائص بكتريا *L.reuteri*

تمتلك سلالة بكتريا *L.reuteri* خصائص علاجية (probiotic) لأنها تقاوم ظروف الحموضة المنخفضة والانزيمات واملاح الصفراء كما انها تستطيع الالتصاق بالغشاء المخاطي للأمعاء وتتنافس مع الاحياء المجهرية المرضية وتنتج مواد مضادة لها والأهم من ذلك امانة الاستعمال صحيا (Niamah et al.,2023) ومن هذه الخصائص :

1- نمو وتكاثر مستعمرات *L.reuteri* في القناة الهضمية

تختص بعض مواقع الجهاز الهضمي بعمليات الهضم والامتصاص وقد تطورت لتكون بيئات قاسية لا تسمح لمستعمرات الاحياء المجهرية بالنمو مثل انخفاض الاس الهيدروجيني الناتجة عن أحماض المعدة والشد السطحي لاملاح الصفراء في الجزء العلوي من الأمعاء الدقيقة. وبالتالي فإن الخطوة الأولى لمستعمرات الجهاز الهضمي هي القدرة على البقاء على قيد الحياة في مثل هذه البيئات ومنها بكتريا *L.reuteri* التي تلتصق بعض سلالاتها بالخلايا الظهارية للأمعاء والميوسين (Krumbeck et al.,2016). ويعتقد أن القدرة على الالتصاق تعتمد جزئياً على قدرتها في تكوين الأغشية الحيوية (Hussain et al., 2024).

وجد Frese et al.,(2013) أن سلالات القوارض المزودة بتسع سلالات من *L.reuteri* فقط هي التي كانت قادرة على تكوين الأغشية الحيوية داخل الامعاء مقارنة مع سلالات ذات مصادر مختلفة. وذكر ان غياب مستعمرات *L.reuteri* 70902 في الجسم الحي يؤدي إلى القضاء بشكل كامل تقريباً على تكوين الأغشية الحيوية في الفئران الخالية منها.

وجد أن *L.reuteri* RC-14 كان لها القدرة على تثبيط تكوين الاغشية الحيوية الناتجة من بكتريا القولون ومنع التصاقها وتثبيط البكتريا المنتجة لها (McMillan et al., 2011).

2- المنتجات الايضية ذات التأثير المعزز للصحة

ترتبط التأثيرات المضادة للميكروبات لبكتريا *L.reuteri* مع منتجاتها الايضية الخاصة التي تستطيع انتاجها لكونها احد المعززات الحيوية، وذكرت الدراسات أن *L.reuteri* ينتج مجموعة متنوعة من المواد المضادة للميكروبات مثل حامض اللاكتيك وحامض الخليك وبيروكسيد الهيدروجين (Martinez et al., 2009)، والريوترين (Niamah et al., 2023)، والريوتيريسايكلين (Gänzle et al., 2003) ومن هذه المنتجات :

أ- ريوتيرين Reuterin

ينتج مركب Reuterin أثناء تخمير الكليسرول عن طريق تفاعل الإنزيم المساعد B₁₂ المعتمد على الكليسرول والمرتبطة بإنتاج حامض β -hydroxypropionic و trimethylene glycol بواسطة الخلايا اللاهوائية لدرجة تحت درجة حرارة وأس هيدروجيني مناسب. وهو مركب ذات وزن جزيئي منخفض وقابل للذوبان في الماء في الظروف اللاهوائية، و يعد منتج ايضي ثانوي ذو بنية غير بروتينية، مقاوم للعديد من الإنزيمات المحللة للبروتين والدهون، وهو فعال في نطاق واسع من الأس الهيدروجيني، ويمتلك طيف واسع من النشاط المضاد للبكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مثل *H.pylori, Staphylococcus, Salmonella, Shigella, Proteus, Pseudomonas, Clostridium aureus, Escherichia coli*، والخمائر والاعفان (Abuqwider et al., 2022; Niamah et al., 2023).

ب- الهستامين

تمتلك بعض سلالات *L.reuteri* قدرة على تحويل الحمض الأميني L-histidine إلى الهستامين الأميني الحيوي، ويتم تنظيم إنتاجه وما يليه من وظيفة تثبيط في المختبر بواسطة مجموعة من المورثات

Greifova *et al.*, 2017;) histidine decarboxylase (EC 4.1.1.22, HDC) مثل
Thomas *et al.*, 2012). ذكر (Gao *et al.*, 2021) أن تناول HDC + *L.reuteri* عن طريق الفم
يمكن أن يكبح بشكل فعال الالتهاب المعوي عند إصابة بالتهاب القولون الناجم عن حامض ثلاثي
النترين TNBS في الفئران المختبرية وبالتالي تعديل المناعة المعوية.

ت - الفيتامينات

وجد (Molina *et al.*, 2009) أن تناول *L.reuteri* CRL1098 مع نظام غذائي يفتقر إلى
فيتامين B12 يخفف من الأمراض لدى إناث الفئران الحوامل التي تعاني من نقص فيتامين B12. ويمكن
لبعض سلالات *L.reuteri* أيضاً تصنيع L-lysine وحمض الفوليك مثل *L.reuteri* JCM1112 و
L.reuteri 6475 (Thomas *et al.*, 2016).

ث - متعدد السكريات الخارجية (EPS) Exopolysaccharides

تستطيع بكتريا *L.reuteri* إنتاج أنواع مختلفة من السكريات المتعددة الخارجية والتي تكون مهمتها
الاساسية هي الالتصاق بالخلايا الظهارية للأمعاء ومنع التصاق البكتريا المرضية او التي تسبب التعفنات
وتثبيطها ومنافستها على المغذيات (Kšonžeková *et al.*, 2016 ; Salas- Jara *et al.*, 2016).

3- ثبات البكتريا داخل الجسم الحي

أشارت العديد من الدراسات التي أجريت داخل الجسم الحي وفي المختبر إلى أن *L.reuteri* آمن
للاستهلاك البشري حتى بكميات كبيرة (Urbanska *et al.*, 2014). كما هو الحال بالنسبة لجميع الأنواع
الأخرى العائدة لبكتريا حامض اللاكتيك ويمكن العثور على بعض البلازميدات في بعض سلالات
L.reuteri، والتي تلعب دور مهم في تشفير المورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية (Hou *et al.*, 2015).

أشار (Liu *et al.*, 2014) ان سلالات بكتريا *L.reuteri* التي تستطيع النمو في درجة حرارة 47 م
وتحت اس هيدروجيني اقل من 6.7 يعزز من القدرة على البقاء عند تعرض هذه البكتريا لظروف التصنيع
مثل التجفيف او التجميد وتحافظ على اعدادها ضمن المستوى المسموح به.
وتتميز بكتريا *L.reuteri* بالكثير من الصفات التي تجعلها من ضمن المعززات
الحيوية (probiotic) ويوضح الجدول (1-2) بعض الفوائد والسمات الخاصة ببعض سلالات بكتريا
L.reuteri المعزولة من الإنسان والحيوان.

الجدول (1-2) لمحة عامة عن سلالات *L. reuteri* المستخدمة كمعززات حيوية (Hou et al., 2015).

السلالة البكتيرية	مصدر العزل	الصفات والسمات العلاجية
<i>L.reuteri</i> I5007	الخنزير	القدرة على الالتصاق القوي والقدرة التنافسية ضد مسببات الأمراض. تحسين أداء الخنازير من خلال زيادة وظيفة المناعة وحالة مضادات الأكسدة. تعديل فلورا الامعاء.
<i>L.reuteri</i> NCIMB 30242	خنزير	تحسين صحة الجهاز الهضمي. تمنع امتصاص الستيرول sterol .
<i>L.reuteri</i> ATCC 53608	خنزير	التعرف على الكلوبولين المناعي
<i>L.reuteri</i> BSA131	خنزير	مقاومة الأس الهيدروجيني و oxgall والمضادات الحيوية، والأنشطة المضادة للميكروبات ضد مسببات الأمراض المعوية، وتحسين أداء الخنازير.
<i>L.reuteri</i> Pg4	دجاج التسمين	تحمل الأملاح الحامضية والصفراوية. تمنع البكتيريا المسببة للأمراض. التمسك بالخلايا الظهارية المعوية. تحسين أداء دجاج التسمين.
<i>L.reuteri</i> ATCC 55730	حليب الام	التكاثر في الأمعاء. مقاومة التتراسيكلين واللينكوميسين etracycline and lincomycin. الحفاظ على صحة الأمعاء. منع الإسهال. تعديل جهاز المناعة. يستخدم في علاج جرثومة المعدة <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>L.reuteri</i> ATCC PTA 4659	حليب الام	منع السمنة الناجمة عن النظام الغذائي جزئياً.
<i>L.reuteri</i> ATCC PTA 6475	حليب الام	حماية الفئران من الإشريكية القولونية <i>E.coli</i> المعوية النزفية.
<i>L.reuteri</i> ATCC PTA 5289	تجفيف الفم	يحسن رائحة الفم الكريهة؛ تقليل عدد مسببات أمراض اللثة الناتجة من الاحياء المجهرية تحت اللثة.
<i>L.reuteri</i> DPC16	البراز البشري	ينتج الريوترين reuterin
<i>L.reuteri</i> DSM 20016	البراز البشري	ينتج الريوترين reuterin
<i>L.reuteri</i> JCM 1112	البراز البشري	ينتج الريوترين والكوبالامين reuterin and cobalamin
<i>L.reuteri</i> RC-14	المهبل البشري	إنتاج بيروكسيد الهيدروجين. تلتصق بالخلايا الظهارية البولية وتمنع مسببات الأمراض البولية. تعديل المناعة.
<i>L.reuteri</i> GMN-32	الجرذان	ينظم مستويات الكلوكوز في الدم ويحمي خلايا عضلة القلب ويمنع اعتلال عضلة القلب السكري في الجرذان المصابة بداء السكري.
<i>L.reuteri</i> DSMZ 17648	-	تقليل اعداد بكتريا <i>Helicobacter pylori</i>
<i>L.reuteri</i> GMNL-263	-	تخفيف تلف الكبد الذي لوحظ في الفئران المعالجة بالفركتوز العالي؛ حماية الجرذان المصابة بداء السكري الناجم عن streptozotocin من التليف الكلوي المعزز بارتفاع السكر في الدم.
<i>L.reuteri</i> R2	-	نشاط مثبط قوي ضد الفطريات الجلدية <i>Trichophyton tosurans</i> .
<i>L.reuteri</i> TD1	الجرذان	لا تنتج الريوترين، وتظهر بداية مماثلة لمرض السكري من النوع الأول.

تحفز تطور الخلايا التائية التنظيمية؛ ينشط الخلايا الظهارية المعوية بشكل عابر	الجرذان	<i>L.reuteri</i> 100-23
خصائص مضادة للأكسدة فريدة من نوعها للخنزير الغيني، تظهر نتائج واعدة في علاج التهاب القولون.	الخنزير الغيني	<i>L.reuteri</i> BR11
ينتج vitamin B12	العجين المخمر	<i>L.reuteri</i> CRL1098
ينتج Reutericyclin	العجين المخمر	<i>L.reuteri</i> LTH2584

3-2 عملية التغليف Encapsulation

تدخل بكتريا المعززات الحيوية (probiotic) في إنتاج العديد من الأغذية الوظيفية والمنتجات الصيدلانية وهي تلعب دورًا مهمًا في تعزيز وحفظ صحة الإنسان. ومن أجل المحافظة على فوائد صحية، يجب أن تكون سلالات بكتريا المعززات الحيوية موجودة ضمن مستوى مناسب أثناء فترة خزن وتسويق المنتج حتى الاستهلاك من أجل الحفاظ على اعداد مرتفعة لمستعمراتها وصولاً الى الامعاء الدقيقة واستيطانها. اشارت الدراسات السابقة الى التأثير الكبير لظروف الجهاز الهضمي على الخلايا الحرة لبكتريا المعززات الحيوية (de Vos *et al.*,2010). لذلك هدفت دراسات سابقة الى حماية هذه الخلايا من خلال احاطتها بغشاء حيوي يحافظ على اعداد البكتريا ضمن الحدود المطلوبة والتي تكون (10^6-10^8) وحدة تكوين مستعمرة/غم (Kailasapathy.,2009).

عملت تقنيات التغليف لحماية الخلايا البكتيرية إلى المحافظة على الاعداد المرتفعة (اعداد قابلة للحياة) للمعززات الحيوية في المنتجات الغذائية وكذلك في الجهاز الهضمي. التغليف هو عملية احاطة المركبات الفعالة والبكتريا النشطة داخل مادة حاملة وهي أداة مفيدة لتحسين بقاء الخلايا الحية في الاغذية وحمايتها، وإطالة عمر تخزينها وتحويلها إلى شكل مسحوق سهل الاستعمال (Pandey *et al.*,2021). ويمكن للتغليف أن يعزز الإطلاق المتحكم فيه ويحسن توصيله إلى موقع التأثير، وبالتالي تعزيز فعالية سلالة بكتريا المعززات الحيوية. كما يمكن لهذه العملية أيضًا منع بكتريا المعززات الحيوية من التكاثر في الطعام مما قد

يؤدي إلى تغيير خصائصها الحسية. لذلك يجب أن تكون المواد المستعملة في التغليف صالحة للاستهلاك البشري وقابلة للتحلل الحيوي وقادرة على تكوين حاجز بين البكتيريا ومحيطه (Yang *et al.*, 2020).

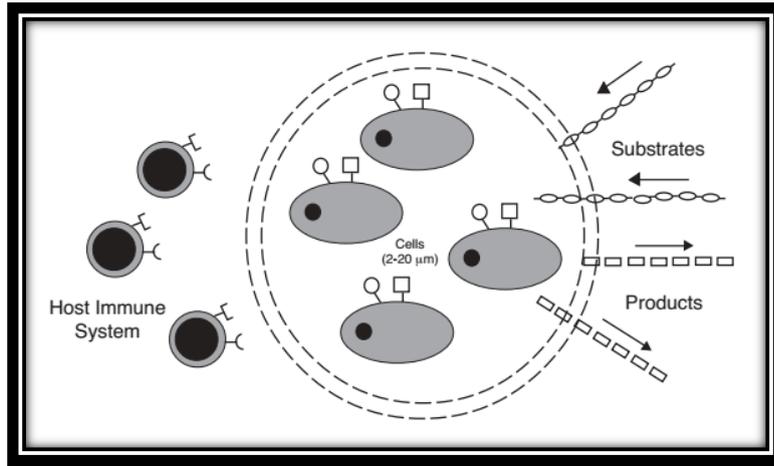
يعمل التغليف كوسيلة لحماية البكتيريا من العوامل البيئية الشديدة. ويتمثل هدف التغليف في إنشاء بيئة دقيقة حيث ستبقى البكتيريا على قيد الحياة أثناء التصنيع والتخزين ويمكن إطلاقها في المواقع المناسبة (مثل الأمعاء الدقيقة) في الجهاز الهضمي. وكان الهدف الرئيسي من تغليف بكتريا المعززات الحيوية هو الحفاظ على الاعداد الحية من انخفاض درجة حموضة وتأثير الشد السطحي لاملاح الصفراء Dahiya *et al.*, 2023)

تعتبر عملية التغليف عملية فيزيائية أو ميكانيكية وذلك بحبس المادة المراد تغليفها في مادة الغلاف من أجل إنتاج جزيئات بأقطار تتراوح من بضعة نانومتر إلى بضعة ملليمترات. لذا، فإن المغلفات عبارة عن جزيئات صغيرة تحتوي على عامل نشط أو مادة نشطة محاطة بغشاء أو غلاف. تشمل مواد التغليف مجموعة متنوعة من البروتينات والكربوهيدرات والدهون والشمع ثلاثم المادة الفعالة المراد حمايتها. ويعتقد ان سوق التغليف العالمي يزداد بمعدل نمو سنوي يبلغ 13.70% ليرتفع الى 19.35 مليار دولار بحلول عام 2025 بسبب الميزات الجيدة للتغليف اتجاه الاغذية (Grand, 2019).

يمكن تحقيق حماية المركبات الفعالة حيويًا، مثل الفيتامينات ومضادات الأكسدة والبروتينات والدهون باستعمال العديد من تقنيات التغليف لإنتاج أغذية وظيفية ذات وظائف محددة واستقرار عالي لاعداد البكتريا. لذا فان تقنيات التغليف تستعمل في العديد من التطبيقات في صناعة الأغذية مثل التحكم في التفاعل التأكسدي وإخفاء النكهات والألوان والروائح وتوفير إطلاق منتجاتها المعززات الحيوية الايضية بشكل منظم وإطالة العمر الافتراضي وغيرها. في حالة بكتريا المعززات الحيوية يتم حمايتها خلال الفترة من معاملات تصنيع المنتج الغذائي إلى استهلاكه. العوامل الرئيسية التي تؤثر على البكتريا المغلفة هي: ظروف التصنيع (درجة الحرارة، الأكسدة، الاجهاد، إلخ) والجفاف (بالنسبة لمنتجات الأغذية الجافة) وظروف التخزين

(التغليف والبيئة: الرطوبة، الأكسجين، درجة الحرارة، إلخ) والتحلل في الجهاز الهضمي (انخفاض الاس الهيدروجيني في المعدة وأملاح الصفراء في الأمعاء الدقيقة) (Chávarri et al.,2012).

اشار (2012) Chávarri et al. الى وجود عدة عوامل يجب مراعاتها من اجل الحصول على افضل عملية تغليف لبكتريا المعززات الحيوية ويكون الاطلاق في المنطقة المرغوبة والمحددة في الامعاء من هذه العوامل حجم البكتريا المغلفة وتوفر مواد التغليف وطريقة التغليف (الشكل 2-2).



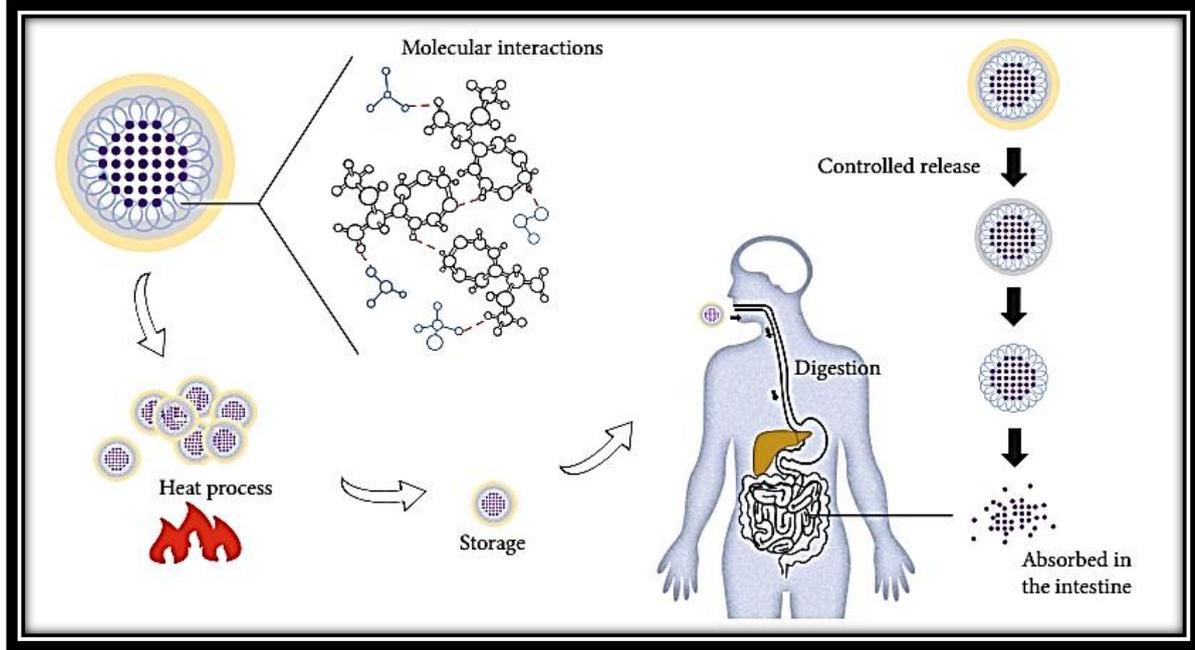
الشكل (2-2) مبدأ وعمل التغليف

يوضح الشكل عزل الحاجز الغشائي الخلايا عن الجهاز المناعي للمضيف مع السماح بنقل النواتج الايضية والمغذيات خارج الخلية. غشاء ذو مسام انتقائية الحجم (30-70 كيلو دالتون): (Kailasapathy.,2002).

استعمل التغليف الدقيق للخلايا الحية والمواد الفعالة حيويًا في العديد من مجالات العلوم الحيوية بما في ذلك الطب (Blasi et al.,2013) و علوم التغذية (Burgain et al.,2011) وتصنيع الاغذية (Malmo et al.,2021).

يجرى تغليف المواد الأساسية في كبسولات او مغلفات دقيقة في طبقة واحدة أو عدة طبقات من مواد التغليف عن طريق مجموعة متنوعة من التفاعلات الجزيئية، منها الجذب الكهروستاتيكي وقوى فان ديرفالز والترابط الهيدروجيني أو التفاعل الأيوني. تحمي مواد التغليف المادة الأساسية كالأحياء المجهرية من الظروف غير الملائمة كدرجات الحرارة العالية والأكسجين ونفاذ الرطوبة أثناء التصنيع والنقل والتخزين،

ومن ظروف الجهاز الهضمي للإنسان الذي يمكن فيه إذابة الطبقات الخارجية في حموضة المعدة ، ثم يتم إطلاق المواد الأساسية وامتصاصها في الأمعاء الدقيقة (الشكل 2-3) (Yang *et al.*, 2020).



الشكل (2-3): دورة الكبسولة الدقيقة، من مرحلة التغليف الى مرورها بالجهاز الهضمي. Yang *et al.* (2020)

يتطلب تحضير المغلفات الدقيقة مواد بسيطة وإنتاجاً مستمراً وتكلفة إنتاج منخفضة وصديقة للبيئة. فضلا عن ذلك، فإن الشيء المهم بالنسبة للكبسولات الدقيقة المطبقة في صناعة الأغذية هو التأكد من أن مواد التغليف والمواد الأساسية الداخلة في التغليف تفي بمعايير سلامة الأغذية، وقد تم استعمال عملية التغليف الدقيق Microencapsulation للتغلب على مشاكل سرعة التحلل وعدم الاستقرار والتحرير المتحكم فيه للمكونات الوظيفية للأغذية (Bakry *et al.*, 2016).

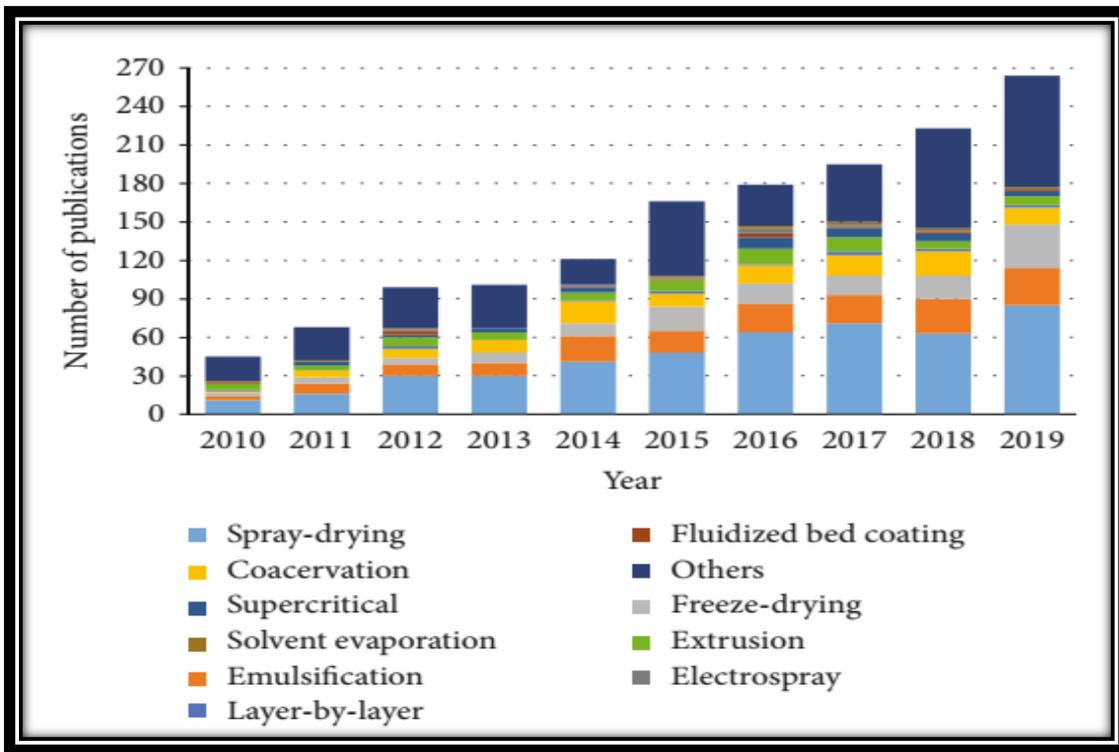
ذكر (Alu'datt *et al.*, 2022) طرق مختلفة للتغليف الدقيق لبكتريا المعززات الحيوية تتضمن استراتيجيات مختلفة واسعة وتقنيات تجفيف متنوعة تُمارس على نطاق واسع في صناعة الأغذية مثل التجفيف بالتجميد freeze drying، والتجفيف بالرشاد spray drying والتبريد بالرشاد spray

chilling والبتق المشترك coextrusion وحبس المصفوفة الهلامية gel-matrix entrapment وطلاء طبقة الموائع fluid bed coating والاستحلاب وغيرها.

استعملت مواد مختلفة في التغليف، تكون بمفردها أو مجتمعة كنظام واقى لتحسين استقرار بكتريا المعززات الحيوية، ومن هذه المواد البروتينات المختلفة والنشا والكاربوهيدرات مثل الجينات وكاراجينان و صمغ الجراد (صمغ حبة الجراد عبارة عن مادة متعددة السكاريد مستخرجة من بذور *Ceratonia Siliqua* ومن المعروف أيضا باسم صمغ الخروب) وكابا-كاراجين kappa-carrageenan ومسحوق الحليب منزوع الدسم وبروتينات شرش الحليب و صمغ الزانثان والجيلان والكايتوسان والجيلاتين وال صمغ العربي وغيرها (Niamah et al.,2021).

تتمتع تقنية البثق Extrusion technology المستعملة في عملية التغليف بمزايا مثل التطبيق البسيط والكبسولات المنتظمة أكثر من طريقة الاستحلاب (Martin et al.,2015) Emulsion ولكن قد تسبب انتاج الكبسولات الأكبر حجماً مما يؤدي الى انخفاض كفاءتها. من ناحية أخرى ان طريقة التجفيف بالرذاذ لا يمكن التحكم في ظروفها خصوصا درجة حرارة الخروج (Yıkmış et al.,2018). لذا فان اختيار مواد التغليف سوف يؤثر بشكل ايجابي او سلبي على كفاءة عملية التغليف، كما تعطي طريقة المستحلب والبتق مغلفات دقيقة رطبة ولغرض استعمالها او خزنها تحتاج الى عمليات تجفيف اخرى (Naveena and Nagaraju.,2020).

يوضح الشكل (2-4) الدراسات السابقة التي تناولت تقنيات التغليف الدقيق شائعة الاستعمال من عام 2010م إلى نهاية عام 2019م. اذ يظهر ان تقنية "التجفيف بالرش Spray-Drying" جاءت اولاً وهو ما يمثل ثلث اعداد الدراسات السابقة، يليه طريقة المستحلب emulsification ثم طريقة التجفيف بالتجميد freeze-drying و طريقة التماسك coacervation.



الشكل (2-4): عدد الابحاث المنشورة من 2010 إلى 2019 بشأن تطوير تقنيات التغليف الدقيق في الاغذية المتواجدة في مستوعب Scopus باستعمال الكلمة المفتاحية : " التغليف الدقيق " و "الغذاء" (Yang et al., 2020).

يعمل التغليف الدقيق كطريقة فعالة لتوصيل بكتيريا المعززات الحيوية probiotics إلى موقع عملها داخل جسم المضيف (Albertini et al., 2010). يساعد التغليف الدقيق على حماية البكتيريا من الظروف الخارجية في الطعام وأثناء المرور عبر الجهاز الهضمي ويعزى ذلك لقدرته على حماية الخلايا البكتيرية عن طريق الاحتفاظ بها داخل غشاء مرن متعدد أو نظام متكونة من عدة مواد وعدة طبقات وهذا يعمل على تحقيق افضل فائدة من تناول الاغذية الحاوية على معززات حيوية (Choudhury et al., 2021).

اشار (Rodrigues et al., 2020) و Zam (2020) بإمكانية استعمال التغليف الدقيق للمعززات الحيوية لحماية قدرتها على البقاء أثناء المعاملة الحرارية والتخزين وعند مرورها في ظروف المعدة والامعاء وبالتالي تأمين توصيلها إلى المواقع المستهدفة في الجهاز الهضمي. يعد الاختيار المناسب لمواد التغليف أمراً بالغ في الأهمية لعملية التغليف لأن مواد التغليف لها تأثير كبير على استقرار وخصائص وفعالية

الكبسولات الدقيقة. وعادة ما يعتمد على اختيارات لمواد التغليف بالتجفيف على الخصائص الفيزيائية والكيميائية مثل الذوبان والوزن الجزيئي والتبلور والانتشار والانصهار وسعة تشكيل الغلاف وخصائص الاستحلاب.

4-2 مواد تغليف خلايا المعززات الحيوية Encapsulating materials for probiotic cells
تستعمل الكثير من الكاربوهيدرات مثل التريهالوز والسوربيتول واللاكتوز والصمغ العربي وغيرها في تغليف البكتريا والمواد الفعالة للمحافظة عليها من الظروف الخارجية اثناء عمليات التصنيع Garvey *et al.* (2013).

وجد Foerst *et al.* (2012) عند اضافة 25% (وزن/وزن) تريهالوز أو سوربيتول لتغليف *L.paracasei* F19 باستعمال المجفف بالتفريغ بدرجة حرارة 15م وضغط 15 ملي بار لمدة 22 ساعة ادى لزيادة نسبة البقاء من 29% إلى 70% و54%، على التوالي. كما عززت بقاء الخلايا البكتريا سلالة *L.acidophilus* مقارنة بالخلايا الحرة (غير مغلقة) من 18.9% إلى 37.9% بعد إضافة 20% (وزن/وزن) تريهالوز بضغط تجفيف 0.11 ملي بار على درجة حرارة الغرفة لمدة 4 أيام. كما ادى إضافة 1% (وزن/وزن) من السوربيتول إلى عالق بكتريا *L.helveticus* WS1032 إلى مضاعفة مدة البقاء والعيوشية بعد التجفيف بالتفريغ عند 100 ملي بار و 43م و 12 ساعة).

اشار Kieps *et al.* (2022) الى عدم قدرة بعض مواد التغليف من تعزيز قابلية بقاء الخلايا بعد التجفيف، فعند إضافة 1% (وزن/وزن) لاکتوز أو إنولين أو صمغ الزانثان لم تظهر أي زيادة ملحوظة في معدلات بقاء الخلايا مقارنة بالخلايا غير المغلفة. كما إن زيادة كمية مواد التغليف تؤثر على بقاء البكتريا لانه يمنع من وصل المواد المغذية اليها وبالتالي جفافها وموتها. كما وجد ان إضافة 5 ملي مولاري من السوربيتول يؤدي إلى زيادة معدل بقاء *L.helveticus* WS1032 لعشرة اضعاف مقارنة مع الخلايا غير المغلفة تحت ظروف 100 ملي بار، 43م، 16 ساعة.

اشار Romano et al.(2016) الى ان زيادة التركيز من 50-250 ملي مولاري للتريهالوز عند تجفيف *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* CIDCA 333، عززت صلاحية الخلايا. ومن المحتمل أن التراكيز الأعلى من مواد التغليف يمكن أن تسبب زيادة في النضوح الأزموزي Osmosis، وبالتالي تؤثر سلبًا على قابلية بقاء الخلايا الحية.

إن اختيار المادة المناسبة لتغليف الخلايا الميكروبية أمر ضروري لاستقرار وخصائص الجسيمات المنتجة. ويجب ألا يكون عامل التغليف سامًا للخلايا، إذ يمكن أن يؤثر بشكل مباشر على المظهر الخارجي وقطر ونفاذية الجسيمات. فضلًا عن ذلك، يجب أن يحمي الخلايا الميكروبية من العوامل البيئية وأن يكون مناسبًا بدرجة كافية في الإطلاق المادة المغلفة أو البكتيريا فيه وان لا يتفاعل مع المادة المغلفة أثناء التغليف (Chen et al.,2017). أثناء التخزين يمكن أن تؤثر كل من درجة الحرارة ومحتوى الرطوبة على قابلية بقاء الخلايا ويعزى ذلك أساسًا إلى أكسدة الدهون في غشاء الخلية. لذلك، فإن استعمال المواد ذات القدرة على الاحتفاظ بالرطوبة يحسن من بقاء الخلايا المغلفة. فضلًا عن ذلك، قد لا تكون المواد التي تطلق الخلايا المغلفة بالكامل عند تعليقها في العصارة المعدية مناسبة لحماية الخلايا أثناء مرورها عبر الجهاز الهضمي (Rajam and Anandharamakrishnan.,2015). ومن هذه المواد :

2-4-1 شرش الحليب Whey Milk

يعد شرش الحليب ناتج ثانوي من صناعة الجبن و وله قيمة غذائية عالية من حيث الأحماض الأمينية الأساسية والبروتينات واللاكتوز والاملاح والدهون، لذا فهو يمتلك خصائص حيوية وتقنية وظيفية جيدة ومثيرة للاهتمام فهو يحتوي على 50% من مكونات الحليب وغالبًا ما يتكون من لاكتوز (4.9% من شرش الحليب الكلي) وبروتين (0.7% من شرش الحليب الكلي) وأجزاء البروتين الرئيسية بيتا- لاكتوكلوبولين ألفا-لاكتالبومين والألبومين. بغض النظر عن الدهون القليلة والفيتامينات والمعادن وسكر اللاكتوز ويعد شرش الحليب مصدرًا جذابًا للبروتينات الوظيفية والبيبتيدات ذات الأحماض الأمينية المميزة مثل بروتينات المناعة واللاكتوفيرين (Smithers,2008).

يستعمل مسحوق شرش الحليب (WP) بشكل شائع في المنتجات الغذائية مثل البسكويت والشوكولاتة والزيادي. ومع ذلك فإن بروتين شرش الحليب بدون عوامل إضافية لا يبني مصفوفات قوية ومستقرة هيكليا (Krunić *et al.*, 2019)، يصبح هذا أكثر أهمية في حالة شرش الحليب الحلو، بالمقارنة مع بروتين شرش الحليب المركز وذلك بسبب انخفاض تركيز البروتينات في شرش الحليب الحلو. علاوة على ذلك فإن الكازينات أرخص بكثير من بروتين شرش الحليب المركز وذلك بسبب تكلفة إنتاج الأخير (Hurst *et al.*, 1990).

تستعمل بروتينات الشرش في تغليف بكتريا المعززات الحيوية الحليب منزوع الدسم وتركيز بروتين شرش الحليب ويمكن لهذه البروتينات من المحافظة على معدلات البقاء العالية لخلايا بكتريا المعززات الحيوية (probiotic). تعد هذه مواد تغليف مناسبة بمفردها أو مع مواد حيوية أخرى، ويعزى ذلك لخصائصها الوظيفية مثل قابلية الذوبان العالية وقدرة استحلاب جيدة لتكوين لزوجة منخفضة في المحلول وخصائص تشكيل الغشاء (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2013).

تعمل مكونات الحليب (مثل اللاكتوز) في مواد التغليف على تعزيز الحماية وبقاء الخلايا الحية أثناء التجفيف بالرش لبكتيريا حمض اللاكتيك. ويرجع سبب ذلك إلى أن تبخر الماء يعمل على تفاعل اللاكتوز مع المجاميع الفعالة في البروتينات والدهون الفوسفاتية في غشاء الخلية وبالتالي يقلل من تحطم الغشاء ويطيل مدة بقاء الخلايا (Maciel *et al.*, 2014). وذكر (Soukoulis *et al.*, 2014) أن البيبتيدات المشتقة من بروتينات شرش الحليب يمكن أن تحفز نمو بكتريا المعززات الحيوية عن طريق إعاقه الأكسدة الذاتية للدهون. فضلا عن ذلك، تتميز بروتينات الحليب بالمرونة لتغليف خلايا بكتريا المعززات الحيوية محبة أو كارهة للماء، وهي مصادر غنية للبيبتيدات النشطة بيولوجياً والتي تقدم تأثيرات تآزرية مع خلايا بكتريا المعززات الحيوية لممارسة آثارها المفيدة على الصحة (Cook *et al.*, 2012; Abd El-Salam and El-Shibiny, 2015).

يعمل بروتين شرش الحليب على تعزيز الصحة بما في ذلك تحسين مستوى الكلايوجين في العضلات اثناء التمارين الرياضية والحماية من ارتفاع ضغط الدم (Saadi et al., 2024). وقد استعمل شرش الحليب بمفرده أو مع السكريات لتغليف بكتيريا حمض اللاكتيك. وقد أثبتت فعاليته في حماية بكتيريا حمض اللاكتيك أثناء عملية التجفيف (Maciel et al., 2014; Rosolen et al., 2019).

اشارت الدراسات الحديثة إن بروتين شرش الحليب يقاوم الأوساط الحامضية والحرارة ويكون هلاماً ممتازاً ورابطاً للماء ومستحلباً فضلاً عن خصائص تكوين الرغوة والاستقرار الحراري. كما لا يوجد تأثير ضار عند الرقم الهيدروجيني 1.8 لشرش الحليب ويكون ثابت مع وجود انزيم الببسين ويكون تأثير الانزيم على بروتين الألبومين بينما يبقى بروتين شرش الحليب الرئيسي بيتا- لاكتوكلوبولين سليماً دون تأثير (Zhao et al., 2022 ; Diaz et al., 2022).

أكد Jantzen et al., (2013) أن مسحوق شرش الحليب الحلو هو مادة تغليف مناسبة لبكتيريا المعززات الحيوية. ولغرض التغلب على عيوب استعمال بروتينات شرش الحليب المعزول WPI كمواد تغليف هو دمجها مع مواد تنتج معقد مثل ربطه بمركب الكركمين الكاره للماء ذو خصائص مضادة للأكسدة، لان الطبيعة المحبة للماء hydrophilic لبروتينات WPI تحد من قدرتها على توفير حاجز رطوبة فعال (Mis et al., 2020). كما ثبت أن فعالية بروتين شرش الحليب المتحلل بالماء (HWP) جيدة للتغليف، مما يعزز بقاء المعززات الحيوية أثناء المعاملة والتخزين، ويعزى هذا التأثير الوقائي للببتيدات الصغيرة في HWP والطبيعة المحبة للماء لها التي عززت التفاعل مع أغشية الخلايا. الا ان التحلل الفائق لـ HWP ينتج الطعم المر بسبب انتاج بعض الببتيدات الصغيرة والاحماض الامينية (Doherty et al., 2010).

أصبحت بروتينات الحليب في الآونة الأخيرة مثل بروتينات شرش الحليب المعزولة WPI والكازين شائعة جدًا لتغليف المواد المتطايرة لأنها تشكل مستحلبات مستقرة عن طريق التشتت والامتصاص في واجهة الزيت والماء مما يخلق طبقة مقاومة متعددة حول قطرات الزيت (Jafari et al.,2008).

تعد بروتينات الشرش التي تنتج أثناء تصنيع الجبن مادة تغليف مثيرة للاهتمام لأنه ذو فعالية عالية في حماية الاحياء المجهرية أثناء تجفيف الرذاذ وتحمل ظروف الجهاز الهضمي. ومع ذلك فقد أظهر ضعفاً في الحفاظ على اعداد البكتيريا المجففة بالرذاذ أثناء التخزين بسبب ضعف خاصية حجز الرطوبة (Khem et al.,2016; Wang et al.,2019).

ذكر Crittenden et al.(2006) ان مستحلبات البروتين والكربوهيدرات والزيت المستخدم في التغليف تعزز بقاء بكتريا المعززات الحيوية المجففة بالرذاذ أثناء التخزين غير المبرد وخلال العبور من الجهاز الهضمي. كما ان إضافة مضادات الأكسدة المحبة للدهون مثل (tocopherols) إلى مصفوفة التغليف تؤدي إلى تحسين بقاء بكتريا المعززات الحيوية أثناء التخزين، ولكن إضافة مضادات الأكسدة المحبة للماء (sodium ascorbate) كان له تأثير معنوي ضار على بكتريا *L.rhamnosus* GG المجففة أثناء التخزين (Ying et al.,2012).

وجد Nag and Das (2013) أن إضافة فيتامين E في الحليب كامل الدسم المستعمل في تغليف البكتريا حسن من ثبات بكتريا *Lactobacillus casei* المجففة بالتجفيد خلال فترة تخزين 20 أسبوعاً عند 25م. ومع ذلك فإن فيتامين E ومضادات الأكسدة الطبيعية الأخرى ذات الوزن الجزيئي المنخفض تكون غير مستقرة عند تعرضها للحرارة والأكسجين أثناء التجفيف باستعمال الرذاذ (Do Carmo et al.,2017).

بين Hoobin et al.(2013) ان سبب بقاء بكتريا المعززات الحيوية المجففة بالرذاذ أثناء التخزين مع وجود الكلوكوز في مزيج تغليف متكون البروتين والكربوهيدرات هو تفاعل الكلوكوز مع غشاء الخلية

والاتحاد مع جزيئات الماء. ووجد إن إضافة الكلوكوز تسببت في انخفاض كبير في درجة حرارة التزجيج Tg عند تجفيف الرذاذ، مما كان له آثار ضارة على الخصائص الفيزيائية للمسحوق مثل قابلية الذوبان أثناء التخزين على المدى البعيد في ظروف الخزن (Ying et al.,2012).

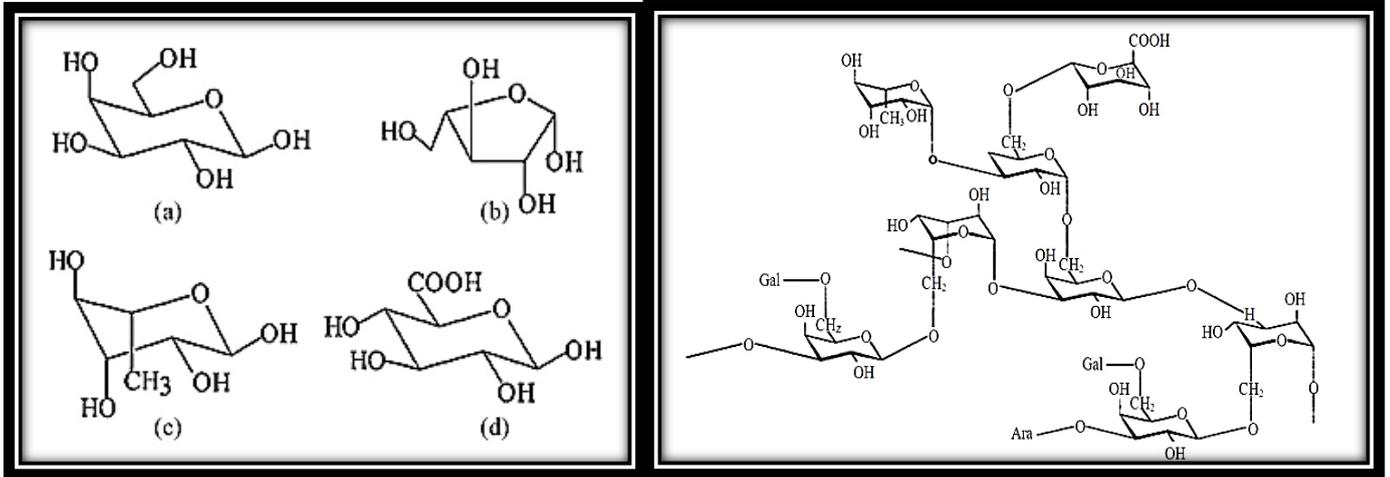
وجد(Ozdemir et al.(2021) ان كفاءة عملية التغليف الدقيقة تراوحت بين 82.34% و 87.19%. بتقنية التجفيف بالرذاذ واستعمال الصمغ العربي (GA) و maltodextrin (MD) وبروتين شرش الحليب المعزول (WPI) كمواد تغليف. كما تراوحت قيم استعادة المسحوق للكبسولات الدقيقة من 65.92% إلى 76.39% ، وتم الحصول ايضا على الاستقرار الحراري الأمثل وقيم Tg أعلى لتركيبات بروتينات شرش الحليب والصمغ العربي و صمغ عربي وبروتينات شرش الحليب ومالتودكتران.

2-4-2 الصمغ العربي (Gum Arabic)

الصمغ العربي GA (أو صمغ السنط) هو متعدد كربوهيدراتي طبيعي (خليط من السكريات والبروتينات) ذو لون ابيض شاحب او برتقالي فاتح يتم الحصول عليه من الإفرازات الطبيعية لأشجار السنغل *Acacia Senegal* وهو غير متبلور وغير سام و عديم الرائحة و عديم اللون والمذاق ويحتوي على مجموعة من السكريات المكتسبة على شكل لايونات الكالسيوم ومغنيسيوم وبوتاسيوم. ويتكون هيكل الصمغ العربي كما موضح في الشكل(2-5) من سكريات متعددة ذات وزن جزيئي عالي وذات سلاسل جانبية متكونة من وحدتين إلى خمس وحدات من β -d-galactopyranosyl مرتبطة مع بعضها برابطة فرعية (1,3) والتي ترتبط بالسلسلة الاساسية برابطة (1,6) (حمدي واحمد،2023).

وتحتوي كل من السلاسل الأساسية والجانبية على وحدات من كلاكتوز و β -L-arabinofuranosyl و β -L-rhamnopyranosyl و β -d-glucuronopyranosyl وحامض الكلوكورونيك 4-Omethyl- β -d-glucuronopyranosyl وتعد الوحدتين الأخيرتين هما المكونين الرئيسين للجزء الأكبر كوحداث نهائية (Arepally and Goswami,2019). وقد تتغير سمات GA

بشكل أساسي، اعتمادًا على عمر الأشجار، والظروف المناخية، وحالة التربة، وحتى مرحلة النضج في الشجرة (Masuelli,2013).



الشكل (2-5) A: التركيب البنائي للصمغ العربي (Dauqan and Abdullah,2013). B: وحدات البناء الكيميائية الرئيسية لنبات الصمغ العربي الغروي المائي. (C) d-Galactopyranose (B) L-arabinofuranose (D) d-glucopyranosuronic acid (Gils and Sahoo., 2010)

يعد الصمغ العربي عامل تغليف فعال للخلايا البكتيرية يعمل على منع جفاف مكونات الخلية وتثبيت الخلايا البكتيرية أثناء التجفيف والتخزين فهو يمتلك خصائص استحلاب جيدة ولزوجة منخفضة ويقوم كطبقة حامية ومثبتة للرطوبة ويمتزج بصورة جيدة مع البروتين والالياف في تركيبات الاغلفة المستعملة في تغليف البكتريا (Liu et al., 2016; Al-Hamayda et al., 2023).

استعمل الصمغ العربي عادة في تغليف الزيوت الأساسية ومركبات الرائحة ويوفر تشتتاً جيداً والاحتفاظ بالزيوت/النكهات الأساسية في المستحلبات بعملية التجفيف. على الرغم من الخواص الجيدة للصمغ تفضل الدراسات السابقة استعمال خلائط الصمغ العربي مع مواد التغليف الأخرى للتقليل من تكلفتها العالية وزيادة الخواص الوظيفية له. فضلا عن المساعدة على تقليل درجة حرارة التزجج وزيادة الاحتفاظ بالرطوبة وتجنب

التكتل وتحسين الخواص الفيزيائية والكيميائية للمسحوق الناتج الذي يتم الحصول عليه عن طريق التجفيف بالرش (Tolun et al., 2016; Arepally et al.,2020; Jafari et al.,2008).

اثبتت الدراسات السابقة ان الصمغ العربي عبارة عن ألياف غذائية تكون كمحفزات حيوية اذ يمكن تخميرها بشكل انتقائي بوساطة *lactobacilli* و *bifidobacteria* وتحويله إلى أحماض دهنية قصيرة السلسلة يمكن الاستفادة منها من قبل المضيف (حمدي واحمد،،2023).

وجد (Colín-Cruz et al.,2019) و (Arepally et al.,2020) ان حوالي 89% من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* بقيت على قيد الحياة بعد تغليفها بمواد الصمغ العربي عن طريق التجفيف. كما أن كفاءة التغليف زادت بزيادة تركيزات الصمغ العربي، ويعزى ذلك إلى وجود البروتينات والألياف، اذ إن وجود البروتينات في الصمغ العربي يسمح بتكوين طبقة واقية على بكتيريا المعززات الحيوية. وربما كان وجود الألياف قد وفر استبدالاً جزئياً لجزيئات الماء في جدران الخلايا وتجنب إصابة الغشاء الخلوي اثناء عمليات التجفيف.

أكد (Leylak et al.,2021) ، ان الصمغ العربي كان الافضل في تحسين الخواص الفيزيائية والكيميائية مثل القابلية للذوبان وكراهية الماء، وخلق بيئة حاملة وحماية أفضل للخلايا مقارنة مع صمغ Locust bean gum (صمغ خروب جالاكتومانان مستخرج من بذور شجرة الخروب) والدكستران عند تغليف بكتريا *Lactobacillus acidophilus*. كما يمتلك الصمغ العربي نتائج جيدة عند خلطه مع بروتينات شرش الحليب مقارنةً بالمواد الأخرى (Arepally and Goswami.,2019). فضلا عن ذلك يعد الصمغ العربي مادة رخيصة نسبياً مقارنة بالمواد الأخرى المستعملة على نطاق واسع مثل الجينات والصمغ الاخرى.

استعمل الصمغ العربي على نطاق واسع في الصناعات الدوائية كحامل للأدوية لكونه مادة غير ضارة من الناحية الفسيولوجية. أيضاً اكدت البحوث الأخيرة على خصائصه المضادة للأكسدة ونتائجه الإيجابية أثناء استخدامه كجزء من علاجات العديد من الأمراض مثل الفشل الكلوي وأمراض القلب والأوعية الدموية والجهاز الهضمي. هناك دراسات عديدة اكدت على كون الصمغ يعمل كمضاد للأكسدة بسبب جزء البروتين الخاص به بشكل أساسي عن طريق بقايا الأحماض الأمينية مثل الهيستيدين histidine والتيروزين tyrosine والليسين lysine والتي تعد في معظمها جزيئات مضادة للأكسدة (Al-Jubori et al., 2018; Mariod et al., 2023).

ذكرت الدراسات إن الترابط بين بروتينات الشرش المعزول والصمغ العربي تعمل على منع التأثير الضار لبيروكسيد الدهون المتكون بسبب ارتفاع درجة الحرارة، وأن الصمغ العربي يعمل كمضاد للأكسدة في تقليل بيروكسيدات الدهون الذي يعتبر آلية محتملة لحماية الخلايا المختلفة أثناء التخزين. كما لوحظ انخفاض في مستعمرات البكتريا بعد فترة شهرين من التخزين في جميع الكبسولات الدقيقة المختبرة عند درجة (37م) أثناء التخزين بسبب تأثيرها السلبي على بقاء الخلايا وزيادة Malondialdehyde(MDA) بسرعة أكبر. كما أن التخزين البارد ضروري لإطالة العمر الافتراضي لبكتريا المعززات الحيوية، رغم انه يزيد بشكل كبير من تكاليف المنتج، اذ انخفضت اعداد المستعمرات بشكل بسيط عند 4م° في جميع التركيبات وبلغت أكثر من لوغارتم 8.43 CFU/g (Jayaprakash et al.,2023 ; Vū et al.,2021).

5-2 التغليف الدقيق لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri*

ذكر Çelik and Turgay.,(2021) عند تغليف سلالة *L.reuteri* DSM 17938 بتقنية

الاستحلاب emulsion polymerization بمواد الالجينات alginate وfructooligosaccharide، لتحسين تواجدتها داخل الجهاز الهضمي اذ تراوحت كفاءة التغليف بين

98.67 و 86.88% على التوالي، بينما بلغت احجام الكبسولات المقدره باستعمال المجهر الالكتروني SEM

من 68.81 الى 351.0 ميكرومتر. وحسبت اعداد الخلايا وبلغت اعلى قابلية بقاء للخلايا الحية باستعمال

مستحلب متكون من 75% fructooligosaccharide و 2% ألجينات الذي يساهم في الحفاظ على اعداد البكتريا في البيئة المعوية.

غلف (2015) De Prisco *et al.* سلالة بكتريا *L.reuteri* DSM 17938 بواسطة خليط من alginate و alginate-chitosan واثبت مقاومتها لظروف إجهاد مختلفة داخل الجهاز الهضمي. كما وجد (2015) García-Ceja *et al* ان عمل محلول تغليف من الجينات- الكيتوسان والالجينات لتغليف بكتريا *L.acidophilus* و *L.reuteri*، كانت الخلايا المغلفة افضل في مقاومة ظروف الجهاز الهضمي في محلول الجينات-الكيتوسان مقارنة باستعمال الالجينات فقط، ويمكن أن يوفر التغليف المشترك بعدة مواد للبكتريا المغلفة حماية اكبر من الظروف الخارجية مقارنة مع التغليف باستعمال مادة واحدة وهذا يطيل من عمر البقاء واعداد البكتريا المغلفة .

درس (2011) Burgain *et al.* تغليف خمس سلالات مختلفة من *L.reuteri* باستعمال الجينات مع النشا و K-carrageenan مع locust bean gum و xanthan مع gallant gum ووجد أن جميع عينات التغليف تتمتع بقدرة تحمل أفضل مقارنةً بالخلايا الحرة عند تعرضها لظروف المعدة المختبرية، وأن محلول تغليف الألجينات مع النشا اعطت أفضل النتائج مقارنة بالاعلغة الاخرى.

اشار (2012) Chitprasert *et al.* ان تعزيز بقاء بكتريا *L.reuteri* KUB-AC5 باستعمال التغليف الدقيق بمركبات الألومنيوم كربوكسي ميثيل سليولوز ونخاله الأرز (AICMC-RB) بنسب مختلفة (1:0 و 1:1 و 1.5:1) وزن/وزن وبسرعة مزج بلغت 1200 و 1500 و 2100 دورة\الدقيقة واطهرت النتائج بقاء البكتريا المغلفة باعداد مرتفعة بعد التعرض لدرجات الحرارة مقارنة مع العينات غير المغلفة التي انخفضت فيها اعداد البكتريا بشكل كبير وبقيت لوغارتم اعداد البكتريا المغلفة عند 10^8 وحدة تكوين مستعمرة اغم .

بين (2017) Rodklongtan and Chitprasert ان تغليف *L.reuteri* KUB-AC5

باستعمال الحليب الفرز مع زيت الريحان بتركيز (12,6,0) ملغم/مل عن طريق التجفيف بالرداذ وكانت درجات حرارة الهواء الداخل من 130-150م، أن استعمال الزيت بمقدار (6 ملغم/مل) مع درجة حرارة داخلية (130م) كانت الافضل في المحافظة على بقاء بكتريا *L.reuteri* KUB-AC5، لكون الزيت يمتلك نشاط مضاد للأكسدة أعلى بكثير من تلك التي لا تحتوي على زيت الريحان الاساسي، وهذا يبين دور المزيغ في تقليل الإجهاد التأكسدي للبكتريا أثناء تجفيف الرذاذ مما ساهم في زيادة اعداد الخلايا الحية القادرة على البقاء.

ذكر (2023) *Muhoza et al.* و (2016) *Khem et al.* الى ان عملية التجفيف تتاثر فيها الخلايا

البكتيرية من ضغوط حرارية وتناضحية ومؤكسدة وجفاف، مما يؤدي إلى تضرر في جدران الخلية ومكوناتها الخلوية وخاصة أغشية الساييتوبلازم والأحماض النووية، وتؤدي درجة الحرارة المرتفعة إلى زعزعة استقرار الأغشية وتغيير تركيب البروتينات وتؤثر على الريبوسومات مما يؤثر على بقاء الخلية، وكذلك فقدان الكبير للماء المرتبط وبيروكسيد الدهون المتكونة يؤدي إلى تحطم وإضعاف طبقة الفوسفوليبيد ثنائية الطبقة الموجودة في جدران الخلية البكتيرية مما ينتج عنها عدم القدرة على اداء الوظائف وفي النهاية موت الخلايا.

وجد (2014) *Schell and Beermann* ان فعاليته الخلايا المغلفة لبكتريا *L.reuteri* DPC16

بمواد alginate-skim milk امتلكت خصائصها الوظيفية ضد بعض مسببات الأمراض أكبر بكثير مقارنة مع الخلايا الحرة (غير المغلفة) عند اختبارها وكان لها القدرة على عبور ظروف الجهاز الهضمي مما يسمح بإطلاق الخلايا في الامعاء الدقيقة وبالتالي القيام بدورها الفعال بما في ذلك قدرتها على التنافس للالتصاق بالخلايا الظهارية وتنشيط التصاق *E.coli*. كما وجد ان استعمال مزيغ التغليف الذي يدخل فيه شرش الحليب كمكون رئيسي يؤدي الى زيادة كفاءة عملية التغليف وتحسين بقاء بكتريا *L.reuteri* عن استعمال طريقة التجفيف بالرداذ.

وجد (Vũ et al., 2021) أن التغليف الدقيق باستعمال مزيج من بروتين شرش الحليب المعزول مع اللكتين توفر أفضل حماية لبكتريا *L.reuteri* KUB- AC5، وذلك لقيام اللكتين بتحسين بنية وبقاء البكتريا المغلفة باستعمال طريقة التجفيف بالرداذ، اضافة لامتلاك بروتينات شرش الحليب المعزول الخصائص المضادة للأكسدة، وبلغ معدل بقاء الخلايا لوغارتم 8.70 و 9.34 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد التجفيف في تركيبات بروتينات الشرش المعزولة واللكتين التي مزجت بنسبة 0:10 و 1:9 على التوالي، مقارنة مع اعداد مستعمراتها قبل التجفيف التي كانت لوغارتم 9.36 وحدة تكوين مستعمرة/مل. كما امتلكت نسبة تغليف 1:9 من الشرش واللكتين اعلى قابلية لبقاء الخلايا بعد المرور عبر القناة المعدية والمعوية مقارنة مع الخلايا الحرة.

6-2 التجفيف تحت التفريغ Vacuum drying

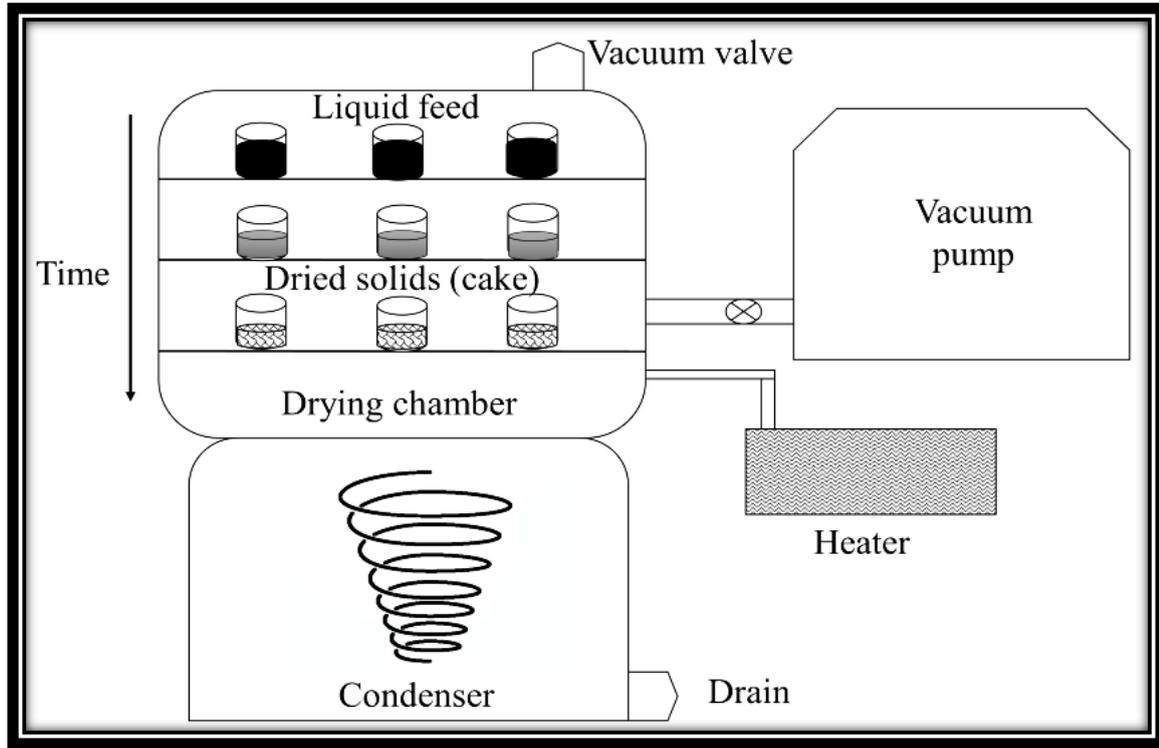
يُعرف التجفيف تحت التفريغ بأنه عملية ازالة الرطوبة من المواد تحت ضغط محدد اقل من الضغط الجوي وبدرجة حرارة منخفضة بما يساعد على الحفاظ على طبيعة المادة المجففة الشكل (2-6)، فضلا عن ذلك يمكن التقليل من تفاعلات الأكسدة أثناء التجفيف بالنسبة لبكتيريا حامض اللاكتيك الحساسة للأوكسجين، ومع ذلك لا يتوفر سوى القليل من المعلومات حول التجفيف تحت التفريغ لتغليف خلايا المعززات الحيوية (Vivek et al., 2023).

تعد الدراسات حول استعمال التجفيف تحت التفريغ في مزارع بادئ حامض اللاكتيك نادرة، كما أن معدلات بقاء بكتريا *L.acidophilus* المجففة بوساطة التجفيف بالتفريغ قابلة للمقارنة عند تجفيفها بالتجميد (تجميد) بدرجة حرارة منخفضة بين (-2 م إلى -3 م). يتكون المجفف بالتفريغ vacuum drying من غرفة توجد بها رفوف تتحمل الحرارة والضغط. يتم وضع الاواني التي تحتوي على الكتلة الحيوية الرطبة على الرفوف، ويتم إزالة بخار الماء باستعمال مضخة تفريغ وتكثيفه في مكثف (أثناء التجفيف بالتجميد يتم تجميد الخلايا أولاً ثم يتم إزالة الماء عن طريق التسامي وذلك لتجنب تدمير الهياكل الخلوية بسبب الفقد المفاجئ للماء بينما في التجفيف بالتفريغ يبقى الماء في حالته السائلة لفترة معينة قبل أن يتبخر تحت الضغط

(المنخفض). اضافة لذلك، تعمل المجففات الفراغية عند درجة حرارة وضغط أعلى، كما أن استهلاك الطاقة أقل بنسبة 40% مقارنة بالتجفيف بالتجميد، الجدول(2-2) (Misra et al., 2021). تكون الضغوط النموذجية للتجفيف تحت التفريغ أعلى من 30-60 ملي بار، وهو ما يتوافق مع نقطة غليان الماء البالغة 25-30 م. اما في التجفيف بالتجميد يكون الضغط أقل من 6 ملي بار (Broeckx et al., 2016). العيب الرئيسي للتجفيف بالتفريغ هو وقت التجفيف الطويل الذي يتراوح من 20 إلى 100 ساعة مقارنة بالطرق الأخرى التي تحتاج الى بضع ساعات (Santivarangkna et al., 2007) وهذا ادى الى استعمال المجفف تحت التفريغ المستمر (Vivek et al., 2023).

طور Hayashi et al.(1983) مجفف تحت التفريغ المستمر تبلغ تكلفته ثلث تكلفة التجفيف بالتجميد. هذا المجفف الفراغي المستمر قادر على تجفيف المواد بنسبة رطوبة تصل 1-4% عند 40 م خلال 5-10 دقائق. اذ لا تتأثر صفات المنتجات المجففة بهذه الطريقة بالدرجات الحرارية. المجففات الفراغية المستمرة متاحة الآن على المستوى الصناعي لتصنيع المضافات الغذائية والإنزيمات والمنتجات الصيدلانية (Santivarangkna et al., 2007).

تشمل التطورات الجديدة في مجال التجفيف تحت التفريغ استعمال الموجات الدقيقة النبضية كمساعد pulse-spouted microwave vacuum drying (PSMVD). قدمت مكعبات الموز المجففة باستعمال PSMVD أيضاً قيمة غذائية أفضل مقاسة بمحتوى حامض الأسكوربيك، والذي وصل إلى 7.96 ملغم\100 غم موز مقارنة مع 4.23 ملغم\100غم للمجفف بالضغط العادي البديل (Jiang et al., 2014).



الشكل (2-6) رسم تخطيطي لجهاز التجفيف بالتفريغ. (Broeckx et al., 2016).

الجدول (2-2): نظرة عامة على الخصائص الرئيسية لتقنيات التجفيف المختلفة.

تجفيف الطبقة المتمعة	التجفيف بالتفريغ	التجفيف بالتجميد	التجفيف بالرداذ	انواع تقنيات التجفيف	
دفعات/مستمرة	دفعات	دفعات	مستمر	نوع العملية	
8.8%	52.2%	100%	12%	مُنْبَت	التكاليف*
17.9%	50.6%	100%	20%	تصنيع	
نعم (إلى حد ما)	لا	لا	نعم	التحكم في خصائص الجسيمات	
معتدلة	معتدلة	معروف جيدا، موصوف جيدا	متزايد	المعرفة/الخبرة	
مادة حبيبية ضرورية	خطوة التكسير ضرورية لتفتيت الكتلة المجففة إلى جزيئات منفصلة	خطوة التكسير ضرورية لتفتيت الكتلة المجففة إلى جزيئات منفصلة	لا	خطوات معالجة إضافية للحصول على جزيئات مسحوق منفصلة	
ساعات	ساعات - أيام	ساعات - أيام	ثواني - دقائق	الوقت	شروط العملية
معتدلة	معتدلة	منخفضة (> 0 م)	عالية (حتى 200 م)	درجة الحرارة	
محدود	تفريغ منخفض (≤ 10 ملي بار)	تفريغ عالي (≥ 10 ملي بار)	محدود	الضغط**	

* بالنسبة لتكلفة التجفيف بالتجميد (Santivarangkna et al., 2007)، ** الفراغ النقي = 0 ملي بار.

وجدوا Forest et al.(2012) خلال دراستهم لتقييم تأثير التجفيف بالتفريغ على استقرار بكتريا *L.paracasei* F19 أنه بالإمكان الحصول على استقرار عالي للخلايا القابلة للحياة في درجات حرارة عند 4 و20 و37م، وبنشاط مائي 7% و 22% و 33% عن طريق عملية التجفيف بالتفريغ مع مادة تغليف مناسبة للبكتريا. اذ كانت جميع خلايا البكتريا المجففة مستقرة جدًا أثناء التخزين على 4م وبنشاط مائي 0.07 عند زراعتها على وسط MRS agar، اذ بلغ معدل بقاء البكتريا الحرة والمغلقة بمواد بعد التجفيف تريهالوز والسوربيتول (29 و 70 و 54)٪ على التوالي. الا انه تم الحصول على ثبات عالي في درجات الحرارة غير المبردة بوجود السوربيتول فقط، في حين انخفض معدل نمو الخلايا المغلقة بمادة تريهالوز عند تخزينه بدرجة حرارة المختبر، ولم يظهر السوربيتول الموجود على الخلايا المجففة أي خسارة كبيرة عند 20م ونشاط مائي 0.22 . ويعزى عدم استقرار الخلايا المغلقة بمكملات التريهالوز إلى التبلور السريع للتريهالوز أثناء التخزين، في حين زادت درجات حرارة التزجج Tg للسوربيتول للخلايا الجافة من -32م إلى 12م أثناء التخزين عند 37م بنشاط مائي 0.07 ، في حين لا يمكن تحديد Tg للخلايا المغلقة بمادة تريهالوز بعد التخزين لمدة 24 ساعة فقط، الا انها بلغت بعد التجفيف -15°م.

استعمل Haldar and Gandhi.(2020) بكتريا *Bacillus coagulans* ككبتريا من المعززات الحيوية مغلقة بمسحوق الحليب باستعمال طريقة vacuum-dried، عند درجة حرارة 63 م تحت ضغط 0.7 كغم/سم² ولمدة 4.5 ساعة، اذ بلغ معدل الخلايا القابلة للبقاء لوغارتم 0.03 ± 8.78 وحدة تكوين مستعمرة/غم وكانت نسبة الرطوبة في المنتج 0.12 ± 4.82 % وحافظت اعداد البكتريا عند نفس المستوى بعد الخزن لمدة 3 اشهر عند درجات حرارة 7 و37 و45م.

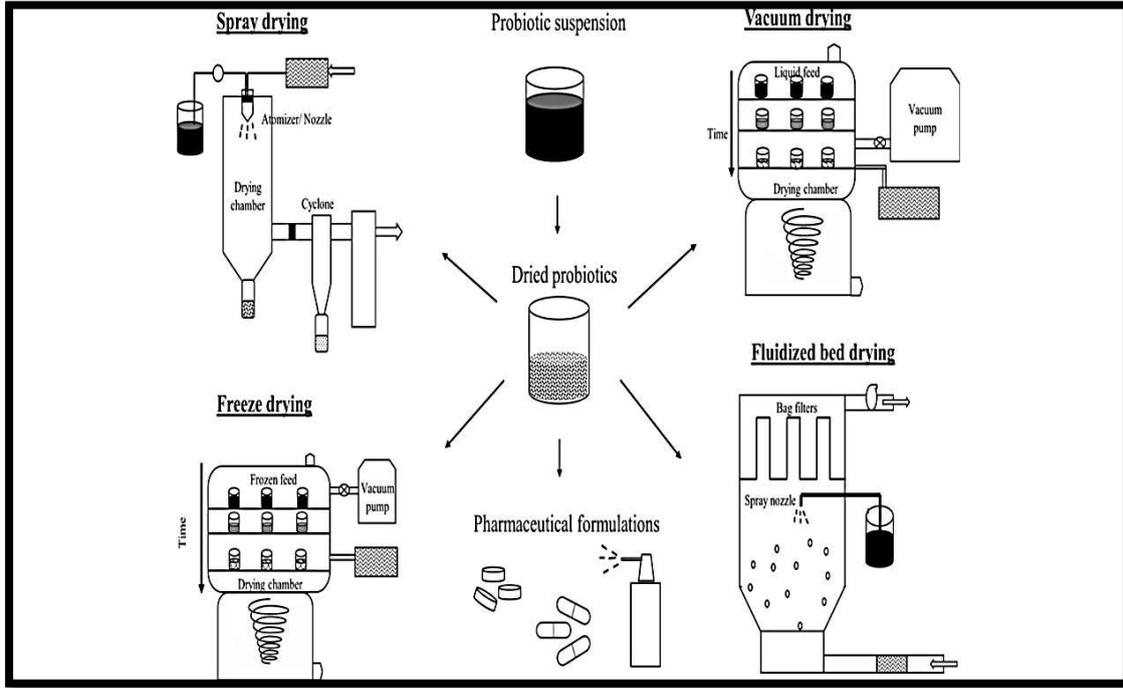
جفت خلايا بكتريا *Lactobacillus helveticus* المنمأة على وسط MRS، بعد استخلاصها وغسلها بمحلول دارئ الفوسفات المنظم عند اس هيدروجيني 7، ثم خلطها بتركيزات مختلفة من اللاكتوز والسوربيتول والأنبولين وصبغ الزانثان، بوساطة فرن التجفيف الفراغي vacuum drier عند 100ملي بار وبدرجة حرارة 43 م لمدة 12 ساعة. وجد ان الخلايا التي اضيف لها 1% سوربيتول أظهرت معدل بقاء أعلى (18%) مقارنة بالخلايا التي لا يحتوي مزيج الغلاف فيها على سوربيتول. علما ان إضافته لم تسبب تغيرات جذرية في معدل التجفيف ومحتوى النشاط المائي للعينات (Santivarangkna et al.,2010).

2-6-1 مبدأ عملية التجفيف بالتفريغ

يشبه التجفيف بالتفريغ vacuum drying التجفيف بالتجميد freeze drying (الشكل 2-7)، مع الاختلاف الرئيسي وهو أن العينات يتم تجفيفها من خلال التبخر بدلاً عن التسامي. وبالتالي تعمل المجففات الفراغية بشكل عام عند درجات حرارة وضغوط أعلى، مقارنة بالمجففات بالتجميد. وتبلغ قيمة الضغط النموذجية بشكل عام لمجففات التفريغ اعلى من 10 ملي بار، بسبب ارتفاع درجات حرارة مقارنةً بالتجفيف بالتجميد، ولكنه يعمل عند درجات حرارة أقل من التجفيف بالرش spray drying، فيمكن اعتباره عملية التجفيف بالتفريغ أكثر بساطةً فيما يتعلق بأضرار درجة الحرارة المرتفعة أو المنخفضة، وبالتالي يحد من فقدان القدرة على بقاء خلايا المعززات الحيوية الحساسة للحرارة. فضلا عن ذلك، فإن غياب الأوكسجين أثناء العملية يمكن أن يقلل من الإجهاد التأكسدي، خصوصا عند التعامل مع خلايا حساسة للأوكسجين مثل Bifidobacteria. في حين وجد ان المواقع الرئيسية المتضررة للخلايا المجففة بالتفريغ هي جدار الخلية وغشاء الخلية وذلك عن طريق تحليلها بتقنية المجهر الالكتروني و FTIR. واستعملت عدة اليات لحماية الأغشية الخلوية من اجل تعزيز بقاء الخلايا الحية، من خلال اضافة مواد تغليف تعمل على حماية الخلايا والمحافظة عليهما من تاثيرات درجات الحرارة او الضغط المسلط خلال عملية التجفيف والعمل على تقليل وقت التجفيف (Broeckx et al., 2016).

2-6-2 ظروف عملية التجفيف بالتفريغ

يعد وقت التجفيف ودرجة الحرارة المستعملة من أهم العوامل المؤثرة على بقاء وحيوية العزلات البكتيرية المغلفة وهذه العوامل تحد من النشاط المائي الموجود في بيئات النمو. من الأفضل أن يكون وقت المعاملة أقصر ودرجة حرارة أقل، لأن ذلك سيقبل من فرصة حدوث ضرر في جدار البكتريا. فقد وجد (Tymczynyn et al. (2008 ان تجفيف بكتريا *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 باستعمال درجات حرارة 30 و 45 و 70 م وضغط 13.3 ملي بار ولفترة 10 دقائق، لوحظ انه بارتفاع درجة الحرارة يزداد تلف الغشاء الخلوي مع انخفاض النشاط المائي.



الشكل (2-7) رسم تخطيطي لبعض اجهزة التجفيف المختلفة المستعملة في تقنيات التغليف الدقيقة
(Broeckx et al.,2016).

وجد (Hongpattarakere and Uraipan.,2015) أن معدلات بقاء الخلايا القابلة للحياة لبكتريا *L.plantarum* CIF17AN2 كانت أعلى عند استعمال الظروف تضمنت مدة حضانة 12 ساعة عند درجة حرارة 37م وضغط 40 ملي بار مقارنة مع استعمال مدة حضانة 5 أيام عند درجة حرارة الغرفة وضغط 400 ملي بار. ويمكن استنتاج أن أوقات التجفيف الأقصر ودرجات الحرارة المنخفضة هي المفضلة فيما يتعلق بزيادة بقاء مستعمرات المعززات الحيوية. كما يعد ضغط التفريغ المستعمل أثناء التجفيف احد العوامل المهمة لكونه يؤثر على درجة الحرارة اللازمة للتجفيف، ويعطي الضغط المنخفض درجات حرارة أقل وبالتالي تقليل الأضرار المرتبطة بالحرارة المستعملة (Bauer et al.,2012).

بين (King et al.,1989) إمكانية تطوير طريقة التجفيف تحت التفريغ من خلال التجفيف المتحكم بدرجات الحرارة المنخفضة واطلق عليها (CLTV) controlled low-temperature vacuum dehydration، وأشار (Vivek et al.,2023) لمقارنة معدلات بقاء بكتريا *L.acidophilus* بعد التجفيف بالتجميد والتجفيف بالتفريغ التقليدي والطريقة المطورة، إذ بلغت معدلات البقاء

15.4% و50% و52.8% على التوالي، ومن خلال تقليل ضغط الغرفة بشكل أكبر فيمكن أن يحدث التجفيف بالتبخير عند درجات حرارة قريبة من 0°م، مما يؤدي إلى تجنب الضرر الناتج عن الحرارة والتجميد. كما ان إضافة الكلسرين ادى إلى تعزيز قابلية البقاء أثناء التجفيف بنسبة تصل إلى 29.5% و73% و73.2% على التوالي.

ان وجود بعض العوامل غير الملائمة تؤثر على جودة واستقرار اعداد البكتريا المغلفة، كما في عمليات التصنيع والتخزين إلى فقدان الحيوية والاستقرار في تركيبات المعززات الحيوية، لذلك يجب إضافة مواد واقية لتحسين عوامل الحفظ لعمليات التجفيف وتكيف الخلايا مع عوامل الإجهاد قبل التجفيف كتدابير مضادة للظروف غير الملائمة كدرجات الحرارة وقوى التناضح وتفاعلات الأكسدة والحموضة فضلا عن قوى الجفاف والإجهاد (Kieps and Dembczyński.,2022).

7-2 مقاومة البكتريا المغلفة لظروف الجهاز الهضمي Resistance of encapsulated bacteria to gastrointestinal conditions

يعمل التغليف الدقيق على زيادة مقاومة المعززات الحيوية لظروف الجهاز الهضمي لكنها تعمل كحاجز يحفظ الخلايا من تأثيرات المواد المفروزة في الجهاز الهضمي وبالتالي يحافظ على اعدادها ضمن المستوى المسموح به ليصل الى الامعاء الدقيقة وتلتصق بها (Barajas-Álvarez et al.,2023).

وجد (Schell and Beermann.(2014) ان تغليف بكتريا *L.reuteri* DSM 20016 بمسحوق شرش الحليب الحلو وصمغ shellac بطريقة الطبقة المميعة وتقنية الطلاء بالرش العلوي يحسن من فعالية البكتريا ويحافظ عليها ويعزز من مقاومة الظروف الحامضية وزيادة بقاء البكتيريا تحت ظروف الجهاز الهضمي أثناء العبور من خلال المعدة والامعاء.

ذكر (De Prisco et al.(2015) أن تغليف بكتريا *L.reuteri* DSM17938 بمحلول يتكون من الالجيئات و الكايتوسان يمكن أن تحسن مقاومة ظروف الإجهاد التي تواجهها خلال عمليات هضم الأغذية وكذلك الحفاظ على خصائصها الوظيفية.

اشار Ali et al.(2021) أن تغليف *L.reuteri* باستعمال مواد مستحلبة يحميها من الظروف القاسية أثناء التخزين والهضم المعدي والمعوي، إذ انخفضت اعداد البكتريا القابلة للحياة غير المغلفة (من لوغارتم 0.36 ± 6.25 إلى لوغارتم 0.06 ± 2.69 وحدة تكوين مستعمرة/مل) أثناء الهضم في المختبر مقارنة بالعينات المغلفة (من لوغارتم 0.07 ± 6.69 إلى لوغارتم 0.06 ± 4.64 وحدة تكوين مستعمرة/مل)، في حين انخفض اعداد البكتريا القابلة للحياة غير المغلفة أثناء التخزين المبرد مقارنة مع البكتيريا المغلفة التي بلغت لوغارتم 0.07 ± 7.23 وحدة تكوين مستعمرة/مل.

وجد Jantzen et al.(2013) ان تغليف بكتريا *L.reuteri* في الخليط المحتوي على 10^9 وحدة تكوين مستعمرة/غم باستعمال شرش الحليب المعزز بالخميرة واستعمال تقنية التجفيف بالرياح، جعل الكبسولات الدقيقة الناتجة مستقرة أثناء التخزين وحافظ على الاعداد القابلة للحياة عند مرورها في سائل المعدة والامعاء، إذ كانت نسبة البقاء للبكتريا المغلفة التي غلفت بمحلول مائي يتكون من 20%(وزن/حجم) شرش الحليب مع 0.5%(وزن/حجم) من مستخلص الخميرة أعلى بنسبة 32% مقارنة بالبكتيريا غير المغلفة المعرضة لظروف الجهاز الهضمي داخل وخارج الجسم الحي. لذا يعد ادخال شرش الحليب كمادة اساس لتغليف البكتيريا خياراً فعالاً للإنتاج الصناعي لبكتريا المعززات الحيوية المغلفة.

اشار Cook et al.(2012) ان قيم الاس الهيدروجيني للمعدة تتراوح بين 1.9-2.5 وهو العامل الأكثر ضرراً لبكتريا المعززات الحيوية. كما ان إنزيمات الجهاز الهضمي مثل الببسين المعدي وتربسين البنكرياس والكيموترسين والبنكرياتين وأملاح الصفراء تعد عوامل أخرى مضرّة للخلايا القابلة للحياة العائدة للمعززات الحيوية.

تعتمد الفعالية الحيوية للمعززات الحيوية على عدد الخلايا القابلة للحياة وتتراوح الكمية الموصى بها بين 10^6 - 10^9 وحدة تكوين مستعمرة/غم يجب تواجدها في الاغذية الوظيفية او الاغذية الحاوية على هذه البكتريا (Hill et al.,2014). ويعد استقرار المعززات الحيوية هو المتطلب الرئيسي لتصنيع المعززات

الحيوية لذلك أثناء عمليات إنتاج الكتلة الحيوية وأثناء فترة الخزن (Shori,2017). المشكلة الرئيسية في استهلاك هذه المنتجات هي أن الاحياء المجهرية لا يمكن أن تحافظ على اعدادها الحية خلال فترة الخزن وفي الجهاز الهضمي، مما تعمل عملية التغليف كحاجز تحافظ على اعداد هذه البكتريا (Martin et al.,2015).

يجب أن تكون التركيبات الخاصة بالتطبيقات الغذائية للمعززات الحيوية مقاومة لعمليات الإنتاج الصناعي ويجب أن تحافظ على معدل بقاء كافٍ من الاعداد بعد تناولها عن طريق الفم وعبورها للجهاز الهضمي و لأجل فرض التأثير المفيد يجب أن يكون هناك عدد اعلى من 10^6-10^7 وحدة تكوين مستعمرة/غم او مل من الاحياء المجهرية القابلة للحياة في المنتجات، ومع ذلك لا يتم اعتماد هذا المستوى الموصى به دائماً في المنتجات التجارية (Zhao et al.,2021; Ross et al.,2005).

وجد (Puttarat et al.,2021) أن الخلايا الحرة لبكتريا *L.reuteri* TF-7 انخفضت لتصل الى لوغارتم 3.8 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد التعرض لوسط المعدة عند اس هيدروجيني 2 لمدة ساعتين وعند تغليفها في كبسولات دقيقة من اللكنين و بروتينات شرش الحليب المعزولة انخفضت اعداد البكتريا بمقدار 2.5 دورة لوغارتمية. بينما انخفضت اعداد *L.acidophilus* NRRL-B 4495 غير المغلفة انخفاضاً كبيراً بلغ لوغارتم 2.7 وحدة تكوين مستعمرة/غم، اما الخلايا المغلفة ببروتينات الشرش المعزولة فقد كان الانخفاض فيها لوغارتم 0.81 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد 3 ساعات من الحضان في وسط المعدة عند اس هيدروجيني مقداره 3 (Cabuk and Harsaa.,2015). وعند التعرض لوسط الامعاء المختبري (Simulated Intestinal Fluid)SIF، انخفض معدل نمو الخلايا الحرة بمقدار لوغارتم 1.6 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد ساعة من الزمن، في حين أن جميع الخلايا المغلفة كان لها انخفاض طفيف غير مؤثر معنوياً.

ذكر Stojadinovic *et al.*(2013) بأن تركيب β -lactoglobulin والمركبات الفينولية يعزز استقرار البروتين خلال عملية الهضم عن طريق البيسين مع انخفاض الاس الهيدروجيني لسوائل المعدة. فضلا عن ذلك ذكر Cirkovic *et al.* (2018) ان التفاعلات مع بعض المركبات الفينولية قد تعيق من هضم بروتينات الشرش المعزولة في الجرذان المختبرية. لذا قد تكون بروتينات الشرش المعزولة هي المسؤولة عن تقليل التأثير السلبي للجهاز الهضمي في وسط المعدة المختبري SGF على الخلايا البكتيرية (Rodrigues *et al.*,2011). ومن المحتمل أن β -lactoglobulin و α -lactalbumin في بروتينات الشرش كانا مقاومين لتحلل البيسين بسبب بنيتهما الكروية (Halabi *et al.*,2020).

2-8 تشخيص المظهر الخارجي للمعزلات الحيوية المغلفة بتقنية المجهر الالكتروني (SEM)

وجد Ali *et al.*(2021) ان حجم الجسيمات لبكتيريا *L.reuteri* المغلفة بالمستحلبات زادت من 0.2 ± 3.5 إلى 0.4 ± 4.8 μm بواسطة المجهر الالكتروني. ذكر Sharifi *et al.*(2021) ان الشكل السطحي للكبسولات الدقيقة المجففة بالتجفيد اظهرت بنية مسامية ولم يكن لها شكل معين بناءً على صور المجهر الالكتروني SEM، بينما أظهرت الكبسولات الدقيقة المجففة بالرداذ شكلاً شبه كروي ولها سطح مقعر ومتعرج ومتجعد. وتتأثر الخصائص الهيكلية للكبسولات الصلبة بالكثافة الظاهرية وقابلية التدفق وغيرها الذي يؤثر بشكل مباشر على التركيب الهيكلي للمغلفات التي تحمي البكتيريا.

وجد Vū *et al.*(2021) أن الكبسولات المتكونة من اللكنين المستعمل في تغليف بكتريا *L.reuteri* KUB- AC5 كانت كروية بشكل مثالي وأصغر من الكبسولات الناتجة من بروتينات الشرش المعزولة عن طريق التجفيف بالرداذ، ولم يلاحظ سوى عدد قليل من الخدوش الصغيرة والضحلة نسبيا في عدد قليل من الكبسولات. وتمتلك كبسولات بروتينات الشرش احجاما كبيرة نوعا ما (de Morais *et al.*,2020).

اشار Ying *et al.*(2013) الى العديد من العوامل مثل سرعة التجفيف والخصائص اللزجة والمرونة لمواد التغليف ومعدل تبخر الرطوبة وتصلب مواد التغليف على الجدار قد تكون فعالة في إحداث فتحات داخل الكبسولات وتقليل سطح الجسيمات المجففة عن طريق التجفيف بالرداذ. وكذلك اظهرت صور

المجهر الالكتروني SEM للعينات المغلفة والمجففة بالتجفيد من الصمغ العربي وبروتينات الشرش سطحاً أكثر سلاسة بالمقارنة مع الكبسولات المجففة بالرذاذ (Sharifi et al., 2021). ذكر (Eratte et al. (2015 ان تكوين التجاوييف على سطح الكبسولات نتيجة لاستعمال درجات حرارة عالية وتبخر سريع للرطوبة خلال مرحلة إزالة الرطوبة من البكتريا المغلفة.

9-2 تطبيقات المعززات الحيوية المغلفة

إن تغليف سلالات بكتريا المعززات الحيوية يعد بديلاً فعالاً للحفاظ على قابلية الخلايا المغلفة للبقاء واستقرارها. ومع ذلك يجب اختيار التقنية ومادة التغليف بعناية من أجل تقليل الخسائر أثناء إنتاج كبسولات التغليف وتطبيقها (Rodrigues et al., 2020). ونظراً لفوائد بكتريا المعززات الحيوية الصحية فقد شهد السوق العالمي للمكملات الغذائية والاعذية المحتوية على بكتريا المعززات الحيوية نمواً سريعاً في السنوات الماضية. وفي عام 2019 قُدِّرَت سوق بكتريا المعززات الحيوية العالمية بنحو 48.4 مليار دولار أمريكي ومن المتوقع أن تصل إلى 77.09 مليار دولار أمريكي بحلول عام 2025 (Grand, 2019). لذا يجب ان يكون الاعداد القابلة للحياة من بكتريا المعززات الحيوية المتواجدة في الغذاء عند الحد الأدنى وهو 10^6 - 10^7 وحدة تكوين مستعمرة/غرام أو مل لغرض اعطاء الفوائد الصحية للمضيف (FAO/WHO, 2002).

استعمال العديد من الانظمة الغذائية لتوصيل خلايا المعززات الحيوية. وتنتج شركة Next Foods، من خلال علامتها التجارية (Good Belly Probiotics) العصائر والمكملات الغذائية واللبن الرائب والحبوب التي تحتوي على سلالات من بكتريا *Lactobacillus plantarum* 299v أو *Bifidobacterium animalis subsp.lactis*، ووفقاً لتعليمات الشركة يتم اختبار وحساب اعداد البكتيريا الحية في جميع المنتجات ويمكن أن يساعد الاستهلاك المنتظم في تعزيز الهضم. وعلى نحو مماثل تنتج شركة KeVita مشروبات الكفير المخمرة التي تحتوي على *Bacillus coagulans* GBI-30,6086 وهو احد انواع بكتريا المعززات الحيوية المعروفة. كما تنتج الشركة الكورية Binggrae الحليب المخمر

المعروف باسم Dr.Capsule 1000 والذي يحتوي وفقاً للشركة على سلالات *Lactobacillus* (Rodrigues et al.,2020).

بسبب صعوبة الحصول على معلومات بشأن العمليات التصنيعية في إنتاج المنتجات الغذائية التجارية التي تحتوي على بكتريا المعززات الحيوية المغلفة فقد طورت شركة Micropharma Inc. وشركة Danone Research حليباً مخمراً (Cardioviva™) يحتوي على بكتريا *L.reuteri* مغلفة. أنتجت شركة Balchem Encapsulates ومعهد RosellandLal'food مغذيات وألواح شوكولاتة تصل معدلات توصيل الاحياء المجهرية فيها إلى ما يقرب من 100%. وطورت مجموعة كيري Kerry في أيرلندا بالشراكة مع شركة Chr Hansen عصير برتقال يحتوي على سلالات بكتريا المعززات الحيوية مغلفة (Probio-Tec®) وبقيت اعداد بكتريا المعززات الحيوية قابلة للحياة طوال فترة صلاحية المنتج (Burgain et al.,2011). وبالتالي، يُقترح تغليف الخلايا كبديل لتحسين بقاء البكتريا المعززات الحيوية المضافة في الانظمة الغذائية وخاصة في ظل ظروف الخزن والتبريد (Angiolillo et al.,2017; Zanjani et al.,2017).

2-9-1 بكتريا المعززات الحيوية المغلفة في منتجات الألبان

تعد منتجات الالبان وخاصة الحليب المخمر مثالية لتوصيل بكتيريا المعززات الحيوية التي تحمل وظائف صحية، حيث يمكن أن تعمل كميات الكربوهيدرات والبروتينات والدهون المتوفرة في الحليب هذه على تحسين بقاء البكتيريا المضافة إلى الحليب، وبالتالي فإن صناع الأغذية يهدفون الى تطوير منتجات الالبان التي تحتوي على خلايا بكتريا المعززات الحيوية ضمن المدى المسموح به طيلة فترة الخزن (Vijaya et al.,2015).

اشار Alvarado-Reveles et al.(2019) الى امكانية استعمال مواد خام ذات قابلية هضم عالية مثل حليب الماعز كبديل لحليب الابقار لتطوير منتجات الالبان المتخمرة التي تحتوي على المعززات الحيوية بسبب عدم تحمل أو حساسية المركبات الموجودة في حليب الابقار لبعض المستهلكين. كما يمكن استعمال

تقنيات تغليف للحفاظ على بقاء بكتريا المعززات الحيوية اثناء تعرضها لظروف انخفاض الاس الهيدروجيني في منتجات الألبان.

قام Dimitrellou et al.(2019) بإنتاج وتخزين الحليب المخمر المحتوي على *Lactobacillus casei* ATCC 393 المغلف بالألجينات باستعمال تقنية البثق. أظهرت الخلايا المغلفة قابلية أكبر للبقاء من الخلايا الحرة بعد 28 يوماً من التخزين المبرد، بالإضافة إلى ذلك فقد حسنت من الخواص الحسية للألبان المتخمرة بسبب إنتاج المركبات العطرية التي تنتجها بكتريا *L.casei*.

ذكر Afzaal et al.(2019) بان إنتاج المتلجات اللبنية باستعمال *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 الحرة والمغلفة بالألجينات والكاراجين كمواد تغليف حسن من بقاء الخلايا المغلفة في المتلجات اللبنية مقارنة بالخلايا غير المغلفة تحت التخزين البارد والمرور عبر ظروف الجهاز الهضمي. واستنتج أن مواد التغليف كانت فعالة، واعطت جزيئات الألجينات خاصية إطلاق أفضل للخلايا مقارنة بالجسيمات المغلفة بالكاراجين. كما ظهر سلوك مماثل في عينات اللبن الرائب التقليدي المحتوي على *L.casei* المغلفة.

اشار Dimitrellou et al.(2019) الى ان إنتاج حليب مخمر يحتوي على بكتريا المعززات الحيوية عن طريق التجفيف بالرداذ، زاد من قابلية بقاء خلايا المعززات الحيوية أثناء الإنتاج، ولم تؤثر إضافة الخلايا المغلفة على الخواص الحسية للمنتج. واكد Nale et al.(2018) الحصول على نتائج حسية مرضية لمنتجات الألبان المجففة الجاهزة للأكل والتي تم إنتاجها من خلال تغليف مزرعة الكفير التجارية في مخاليط مالتوديكسترين و صمغ عربي بوساطة تقنية التجفيف بالرداذ.

2-9-2 بكتريا المعززات الحيوية المغلفة في منتجات اللحوم

استعملت بكتريا المعززات الحيوية من بين الأساليب المتاحة لإضافة القيمة الغذائية وزيادة الوظائف الصحية في منتجات اللحوم، وتعد الاغذية التي تحتوي على اللحوم المخمرة والتي يتم تناولها دون طهي بمثابة مركبات فعالة للبكتريا الحيوية، إذ أن عدم التسخين يعزز الحفاظ على قابلية الخلايا الحية الدقيقة للبقاء (Bis-Souza et al., 2019). بين Sharma et al.(2022) تأثير التغليف لبكتيريا حامض

اللاكتيك المقاومة للحرارة عن طريق التجفيف بالريزاد واستعماله في عجينة اللحوم المطبوخة، حيث زادت مستعمرات بكتيريا حامض اللاكتيك المجففة من عددها الأولي وقللت من عدد البكتيريا المعوية في العينات، مما يشير إلى أن عملية التغليف بالتجفيف كان فعالاً في حماية بكتيريا حامض اللاكتيك. وبالتالي يمكن استعمال الجسيمات التي تم الحصول عليها في منتجات اللحوم المطبوخة.

درس(Barbosa et al.,2015) استعمال بكتريا *Lactobacillus curvatus* المغلفة في انتاج السلامي (نوع من اللحوم المخمرة) وباستعمال تقنية البثق واطهرت النتائج قدرة البكتريا على البقاء ضمن الاعداد المطلوبة خلال فترة الخزن فضلا عن انتاج البكتيريوسين الخاص بها مما ثبط البكتريا الاخرى وزاد من العمر الخزني للمنتج.

اشار(Cavalheiro et al.,2019) لامكانية استعمال *L.plantarum* المغلف بوساطة تقنيات البثق والمستحلب في الكوريزو chorizo (نقانق مخمرة اسبانية) أظهرت كبسولات الالجينات الناتجة عن البثق أعداداً أعلى من البكتريا المغلفة أثناء تصنيع المنتج وتخزينه. فضل عن ان الكوريزو المحتوي على هذه البكتريا المغلفة كان حصل على درجة أعلى في القبول العام بالمقارنة مع الكبسولات المنتجة بتقنية الاستحلاب. كما يعد استعمال خلايا المعززات الحيوية المغلفة في منتجات اللحوم بديلاً للمنتجات التقليدية، الا انه يجب مراعاة الخصائص الجوهرية لمنتجات اللحوم، فضلاً عن ظروف تصنيع الأغذية وأساليب التغليف المناسبة(Rodrigues et al.,2020).

2-9-3 استعمالات الاغلفة القابلة للاكل في تغليف المعززات الحيوية

تُعرّف الأغشية الصالحة للأكل بأنها طبقات رقيقة تستعمل كغطاء أو غشاء، فإن الطلاءات الصالحة للأكل تتشكل مباشرة على سطح المنتجات الغذائية. يتم تحضير كليهما باستعمال متعدد السكريات والبروتينات والدهون، ويمكن تصنيفهما كأى مادة تغليف أو طلاء يتم تطبيقها على الطعام من أجل إطالة مدة صلاحيته وسلامته والحفاظ على خصائصه الغذائية والحسية او تحسينها. وبالتالي فإن استعمال الأغشية

والطلاءات الصالحة للأكل يجعل من الممكن تجميع وظائف مختلفة للمنتجات الغذائية (Guimarães et al., 2018).

لا تحتوي الابحاث على تعريف واضح لمفهوم خلايا بكتريا المعززات الحيوية المغلفة أو المحاطة في الأغشية والطلاءات الصالحة للأكل. ذكر (Guimarães et al., 2018) استعمال المعززات الحيوية في الأغشية والطلاءات الصالحة للأكل كطريقة لاحتجاز الخلايا أسهل وأقل تكلفة من تقنيات التغليف، والتي يسهل التعامل معها وتسمح بسهولة تحديد عدد الاحياء المجهرية المغلفة.

وجد (Shahrampour et al., 2020) عدم تأثير المعاملات مثل السُمك والنشاط المائي والذوبان للأغشية الصالحة للأكل المتكونة من الاجينيات والبكتين المضافة لبكتيريا *L.plantarum* KMC45، كما كانت اعداد الخلايا القابلة للحياة مرتفعة أثناء تخزين الغشاء، مما يشير إلى أنه يمكن استعمالها كمواد تغليف للأطعمة. وكذلك استعملت طلاءات الاجينيات الصالحة للأكل المدعمة بالإينولين والأوليكوفركتوز في تغليف بكتريا *L.rhamnosus* CECT 8361 واستعملت في حفظ التوت الأزرق الطازج، مما حسنت المركبات الحيوية من بقاء *L.rhamnosus*، والحفاظ على اعداد مستعمراتها اعلى من لوغارتم 6.2 وحدة تكوين مستعمرة/غم أثناء تخزين المنتج المغلف، ولم يؤثر إضافة الطلاء الحيوي النشط على الخصائص الحسية للتوت الأزرق وأضفى نشاطاً مضاداً للميكروبات على المنتج النهائي، مما قلل من عدد بكتريا *Listeria innocua* (Bambace et al., 2019).

استعملت الطلاءات الصالحة للأكل للحفاظ على الخضروات الطازجة المقطوعة وزيادة مدة صلاحيتها، اذ وضع طلاء صالح للأكل من الألبينات مع بكتريا *Lactobacillus acidophilus* La-14 في الجزر الطازج المقطوع، مما أدى إلى الحفاظ على محتوى الرطوبة وتقليل تغيرات اللون أثناء تخزين المنتج المبرد، وهي عوامل تساعد على التسويق لهذا النوع من المنتجات. بالإضافة إلى ذلك كان الطلاء

داعماً فعالاً لبكتريا المعززات الحيوية حيث أظهر عدد خلايا قابلة للحياة اعلى من لوغارتم 7 وحدة تكوين مستعمرة/غم في نهاية فترة التخزين (Shigematsu et al.,2018).

ذكر (Latif et al.(2023) و Pereira et al.(2018) امكانية استعمال الاغشية القابلة للاكل والمضاف اليها بكتريا المعززات الحيوية في تغليف اللحوم والاسماك المصنعة وهذا ادى الى زيادة في العمر الافتراضي للمنتج وحافظ على الصفات الحسية مثل اللون والمظهر وعمل على تثبيط فعالية بعض الاحياء المجهرية المتلفة وحافظ على اعداد المعززات الحيوية خلال فترة الخزن.

بين Pereira et al.(2018) أن الطلاء القابل للأكل المصنع من بروتين شرش الحليب، والمضاف اليه بكتريا Bifidobacterium animalis Bb-12 و Lactobacillus casei 01، أظهر عددًا مرتفعًا وثابتًا من بكتيريا المعززات الحيوية في شرائح لحم الخنزير خلال فترة صلاحيته مما يشير إلى أن استعمال هذه الاغشية يمكن أن يعزز التأثيرات المفيدة للمستهلكين.

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 المواد Materials

3-1-1 الأجهزة المستعملة في الدراسة

يبين جدول (1-3) الأجهزة والادوات التي استعملت خلال فترة الدراسة.

جدول (1-3) الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة

اسم الجهاز	الشركة المجهزة والمنشأ
جهاز تعقيم (مؤصدة) Autoclave	Gallenkamp (England)
حاضنة Incubator	Binder (Germany)
Hood	Gallen Kamp (England)
washer reader and ELISA ELISA	(Biotek 800 , USA)
حاضنة هزازة Shaker Incubator	Sartorius (Germany)
حمام مائي Water bath	GFL (Germany)
فرن هوائي Oven	UNITEMP LABORATORY OVEN (England)
مازج مغناطيسي ساخن Hotplate Stirrer	Labtech PT DAIHAN LABTECH LMS- 1003 (INDONESIA)
مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	EUTECH INSTRUMENTS – pH700 (Canada)
ميزان حساس Sensitive Balance	KERN and Sohn GmbH, Ziegelei 1, D- 72336 Balingen, (Germany)
مطياف ضوئي Ultraviolet Visible Spectrophotometer	SUNNY UV-7804C (England)
مازج Vortex mixer	Gemmy Ind.(Taiwan)
مضخة تفريغ Vacuum Pump	Phywe (Germany)
جهاز الطرد المركزي المبرد Refrigerating Centrifuge	GEMMY . MODEL: PLC-036H(Taiwan)
جهاز التجفيف بالرذاذ Spray drying	-1992HHIN (Anhydro Type Lab S1-

NR:28017- England)	
Gallenkamp OVL570 010J (USA)	vacuum oven جهاز التجفيف بالتفريغ
FT-IR -84005 (Shimadzu- Japan)	Fourier Transform Infrared Spectroscopy جهاز التحليل بالأشعة تحت الحمراء
TESCAN,Mira3(Czech Republic)	Scanning Electron Microscopes (SEM) مجهر الكتروني
(Olympus- Japan)	Microscope
(wincom , China)	Micro-hematocrit Centrifuge SH 120
U. K	Microtome
Funke Gerber(Japan)	Lacto flash
Shimadzu (Japan)	Thermo gravimetric Analysis جهاز التحلل الحراري الوزني
Sunny(Korea)	Colony Counter جهاز عد المستعمرات
Germany	Micropipette, 20 µl and corresponding tip
Platinum(USA)	Vacuum مضخة تفريغ هواء pump

2-1-3 المواد الكيميائية و البكتريولوجية: Chemicals and bacteriological material

يشير جدول (2-3) اهم المواد المستعملة في الدراسة الحالية والشركة المصنعة وبلد المنشأ

جدول (2-3) المواد الكيميائية والبكتريولوجية المستعملة في الدراسة

المنشأ	الشركة المجهزة	المادة الكيميائية	التسلسل
India	Himedia	Trypton تريببتون	2
Britain	Origin	Paraffin wax شمع البرافين	3
UK	BDH	phenolphthalein Ind. كاشف الفينولفتالين	4
ACG-EGYPT	Generic	Ethanol كحول ايثانول 95%	5
England	(BDH)	Sodium chloride ملح الطعام	6
England	BDH	Sodium hydroxide هيدروكسيد الصوديوم	7

Germany	Whatman	Filter paper Whatman ورق ترشيح واتمان	8
USA	Difco	bile salt	9
USA	Difco	Peptone	10
USA	SIGMA	amylase enzyme ≥ 150 units/mg protein	11
USA	SIGMA	Trypsin enzyme 2500 units/mg	12
سويسرا	Pharmacia	Chymotrypsin enzyme ≥ 40 units/mg protein	13
سويسرا	Pharmacia	pepsin enzyme 2500 units/mg	14
USA	SIGMA	Tetracycline تتراسايكلين	15
بريطانيا	B.D.H	Hcl حامض الهيدروكلوريك	16
سويسرا	Fluka	KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين potassium Dihydrogen phosphate	17
سويسرا	Fluka	Disodium فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين hydrogen phosphate Na_2HPO_4	18
England	B.D.H	kBr بروميد البوتاسيوم	19
India	SRL	Arabic gum الصمغ العربي	20
Chine	B.D.H	EDTA tube مانع التخثر	21
Indian	Origin	Formalin الفورمالين	22
Indian	Origin	Xylene الزايلين	23
USA	Origin	Haemotoxyline and Eosin	24
بريطانيا	B.D.H	Chloroform مذيب الكلوروفورم	25
Huma-star	Germany	Albumin BGA Kit	26
بريطانيا	BDH	Phenol solution فينول	27
USA	Sigma	Pancreatin بنكرياتين	28
Germany	Fluka	بيكاربونات الصوديوم	29
Germany	Huma-star	ALT Kit	30
Germany	Huma-star	AST Kit	31
Germany	Huma-star	Total Protein Kit	32

Switzerland	FLUKA- Garantie	Tri-Sodium citrate	33
العزلات البكتيرية			
جامعة البصرة/ كلية الزراعة- قسم علوم الاغذية		<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	34
ايطاليا	Sasco	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i>	35
ايطاليا	Sasco	<i>Streptococcus thermophiles</i>	36

3-1-3 الاوساط الزرعية : Culture media

يشير جدول (3-3) اهم الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية والشركة المصنعة .

جدول (3-3) اهم الاوساط الزرعية الكيميائية المستعملة في الدراسة

الشركة المجهزة و المنشأ	الوسط الزرعى
Hi-media/India	Man – Rogosa- sharp Agar (MRS) medium
Liofilchem _{sr} -ITALY	Man – Rogosa- sharp Broth (MRS) medium
Hi-media/India	MRS-T agar medium
Hi-media/India	MacConkey agar medium
Hi-media/India	M17 Agar medium
Condalab (Spain)	Mannitol Salt Agar (MSA)

4-1-3 تحضير الأوساط الزرعية

استعمل جهاز Autoclave بدرجة الحرارة 121م لمدة 15 دقيقة بضغط مقداره 15 باوندانج²

لتعقيم الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة .

DeMan ,Rogosa ,Sharpe Broth(MRS-B) وسط 1-4-1-3

حضر وسط (MRS-B) بإذابة 54.3 غم في لتر واحد من الماء المقطر وحسب تعليمات الشركة
المجهزة LiofiIchem_{sr}-ITALY. وضبط الاس الهيدروجيني عند 0.2 ± 6.8 واستعمل في تنشيط
البكتريا.

DeMan ,Rogosa ,Sharpe Agar (MRS-A) وسط 2-4-1-3

حُضِرَ وسط (MRS Agar) بإذابة 67.15 غم في لتر واحد من الماء حسب تعليمات الشركة
المجهزة Hi-media/India، واستعمل لعد بكتريا حامض اللاكتيك على الاطباق.

MacConkey agar وسط 3-4-1-3

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة Hi-media/India بإذابة 55.07 غم في لتر من
الماء المقطر واستعمل الوسط لعد بكتريا Coliform.

MRS-T Agar وسط 4-4-1-3

حضر الوسط الصلب MRS-T Agar حسب الفقرة (2-4-1-3) مع اضافة المضاد الحيوي
(التتراسيكلين tetracycline 50 مايكروغرام/مل، Sigma,USA) واستعمل لغرض عد مستعمرات بكتريا
Limosilactobacillus reuteri (Hekmat et al., 2009).

Mannitol Salt Agar وسط 5-4-1-3

حضر وسط Mannitol Salt Agar (MSA) حسب تعليمات الشركة المجهزة condalab/Spain
بإذابة 111.02 غم في لتر من الماء المقطر واستعمل لعد بكتريا Staphylococci.

3-1-5 تحضير المحاليل المستخدمة في الدراسة

3-1-5-1 تحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) Sodium Hydroxide

حضر 1 عياري و0.1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH بإذابة 4 غم و0.4غم من هيدروكسيد الصوديوم واكمل الحجم الى 100 مل ماء مقطر على التوالي ، واستعمل في تعديل الاس الهيدروجيني وتقدير الحموضة الكلية.

3-1-5-2 تحضير محلول حامض الهيدروكلوريك

حضر محلول 0.1 عياري باخذ 0.833مل من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl واكمل الحجم الى 100مل من الماء المقطر، وحضر محلول 1 عياري باخذ 8.33مل من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl واكمل الحجم الى 100مل من الماء المقطر واستعمل في تعديل الرقم الهيدروجيني وفصل شرش حليب الجاموس وتقدير الحموضة الكلية.

3-1-5-3 تحضير دليل الفينولفثالين Phenolphthalein Indictor

حضر بإذابة 1 غم من الفينولفثالين في 50 مل من الكحول الايثيلي المطلق وأكمل الحجم الى 100 مل باستعمال ماء مقطر واستعمل في تقدير للحموضة الكلية (A.O.A.C.2008).

3-1-5-4 تحضير ماء الببتون 0.1% Peptone water

حضر بإذابة 1غم من الببتون في لتر من الماء المقطر ثم وزع في أنابيب بواقع 9 مل لكل انبوبة واستعمل في اجراء التخافيف العشرية لحساب اعداد البكتريا.

3-1-5-5 تحضير محلول الملح الفسيولوجي 0.85% Normal physiological saline solution

حضر بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر وعقم في جهاز المؤصدة على حرارة 121 م وتحت ضغط 15 باوند/أنج2 ولمدة 15 دقيقة (Garvey et al.,1977). واستعمل في التجربة الحيوانية والاختبارات اللاحقة.

3-1-5-6 تحضير محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) Phosphate Buffer Saline

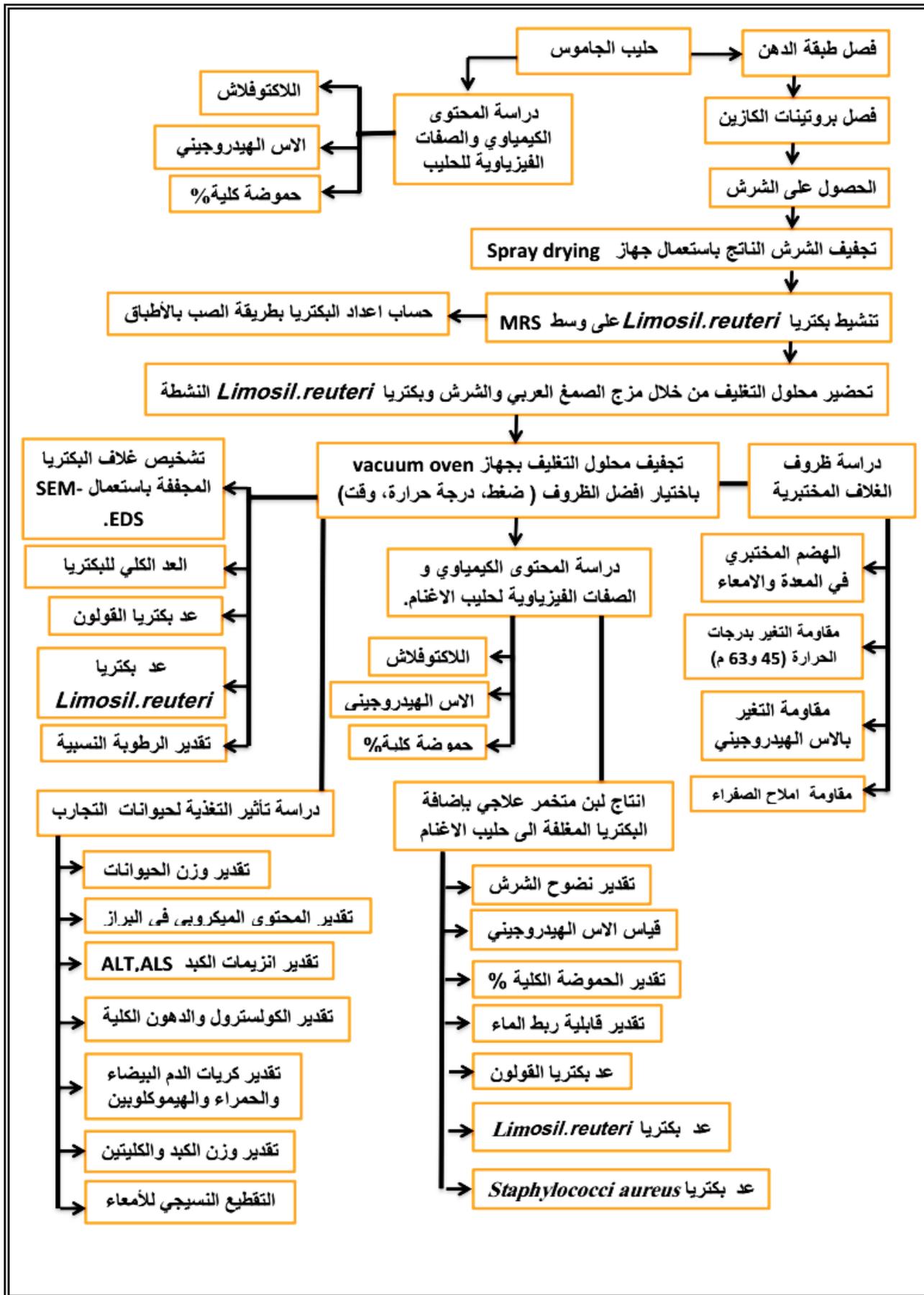
حضر محلول 0.2 مولار من دارئ الفوسفات الملحي وذلك بإذابة 8 غرام من كلوريد الصوديوم، 0.2 غرام من كلوريد البوتاسيوم، 0.2 غرام من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و 1.44 غرام من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 وأكمل الحجم إلى لتر من الماء المقطر Distilled water وكان الاس الهيدروجيني للمحلول 7.2 وعقم المحلول في جهاز المؤائدة على حرارة 121 م وتحت ضغط 15 باوند /انج 2 ولمدة 15 دقيقة (Perrin,2012) واستعمل في التجربة الحيوانية.

3-1-5-7 تحضير صبغة الأيوسين Eosin Stain

أذيب 0.1 غم من مسحوق الصبغة في 100 مل من الماء المقطر ثم رج المزيج جيداً وترك لمدة ساعة ثم رشح (Smyth and Baret, 1980). واستعمل في تصبغ الانسجة الحيوية لحيوانات التجارب.

3-1-5-8 تحضير محلول tetracycline

حضر المحلول بوزن 5 ملغم وأذيب في 100 مل من الماء المقطر مع التسخين والمزج لفترة 5 دقيقة مما يعطي محلولاً شفافاً أصفر إلى برتقالي مصفر حسب تعليمات الشركة SIGMA-USA. تقل فعالية التتراسيكلين في المحاليل ذات الاس الهيدروجيني الأقل من 2 . الاس الهيدروجيني للمحلول المائي بنسبة 1% هو 1.8 إلى 2.8. ثم حفظ المحلول على درجة حرارة 4 م وحمايته من الضوء والرطوبة، لان المحلول يشد لونه الى الغامق عند تعرضه الى الهواء الرطب وأشعة الشمس القوية. واستعمل هذا المحلول في الفقرة (3-1-4-4)(Reynolds,1989).



شكل (1-3) خطوات العمل المتبعة خلال فترة الدراسة

3-2 طرائق العمل

3-2-1 مصدر الحليب

تم الحصول على حليب الاغنام من مركز البحوث الزراعية بكلية الزراعة/جامعة البصرة وحليب الجاموس من المربين في قضاء المدينة/محافظة البصرة.

3-2-2 دراسة المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية للحليب.

قدر المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية لحليب الجاموس والاعنام باستعمال جهاز Lacto flash وذلك حسب تعليمات الشركة المجهزة.

3-2-3 تقدير الحموضة الكلية% والاس الهيدروجيني.

قدرت الحموضة الكلية% حسب ما ذكره (Nielsen (2010) بوزن 9غم من النموذج (حليب جاموس، حليب اغنام، لبن رائب). في ورق واضيف اليه بضع قطرات من كاشف الفينولفثالين المحضر انيا بتركيز 1%، ثم سحح النموذج ضد NaOH (0.1 N) مع التحريك لحين ظهور اللون الوردي واحتسبت النسبة المئوية للحموضة الكلية والمقدرة على اساس حامض اللاكتيك وبحسب المعادلة التالية:-

$$\text{الحموضة الكلية\%} = \frac{\text{عدد مللتترات القاعدة النازلة} \times 0.1 \times 0.098}{\text{وزن العينة (مل او غم)}} \times 100$$

اما قياس الاس الهيدروجيني فاستعمل جهاز pH meter بدرجة حرارة 25 م وذلك بغمر القطب في النموذج (Nielsen,2010).

3-2-4 تحضير شرش حليب الجاموس

تم وصف طريقة (Al-Mashakhi and Nakai (1987) من قبل عزيز واخرون (2017) حيث تمت عملية التخلص من الدهن باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة 4000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقيقة (تحويل) عند درجة 4 م وبعد ازالة الدهن اضيفت قطرات من حامض HCl (1عيارى) والمحضر في الفقرة (3-1-5-2) بصورة مدرجة مع استمرار التحريك لخفض الاس الهيدروجيني الى نقطة التعادل الكهربائي

للحليب (4,6) عند درجة حرارة 25 م ، ثم استعمل الطرد المركزي على 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 4 م لغرض التخلص من الكازين المترسب ثم فصل بقماش ممل وحفظ عند درجة 4 م لحين الاستعمال.

3-2-5 تجفيف شرش الحليب

اتبعت طريقة (Lorenzen and Schrader (2006) الموصوفة من قبل (Raquad et al., (2020) مع بعض التحويلات اذ استعملت درجة حرارة خروج 80م في تركيز الشرش (تحويل 65 م)، وكانت درجة الحرارة المدخلة 160م (تحويل 135م) . وبسرعة جريان بلغت 3.5 مل/دقيقة باستعمال جهاز التجفيف بالرشاد spray drying من نوع Anhydro Lab S1، الصنف رقم DRY-78. لغرض تجفيف شرش حليب الجاموس المستعمل في تغليف بكتريا *L.reuteri*.

3-2-6 تنشيط البكتريا

اتبعت طريقة (Mathivanan et al.,2019) مع بعض التحويلات في عملية تنشيط البكتريا بوزن 0.1 غم من البكتريا المجفدة ووضعت في 100مل من وسط MRS Broth داخل دورق زجاجي وحضنت عند درجة حرارة 37م ولمدة 48 ساعة. ثم بعد ذلك تم نبذت الخلايا البكتيرية المزروعة مركزيا بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة للحصول على كتلة حيوية خالية من الشوائب بعد غسلها بالمحلول الملحي . وكررت العملية هذه ثلاث مرات في كل مرة ينقل 10 مل من البكتريا الى دورق زجاجي جديدة تحتوي MRS broth ثم حفظت الكتلة الحيوية التي تم الحصول عليها عند 4م واستعملت في الاختبارات اللاحقة.

3-2-7 تحضير محلول التغليف

حضر محلول التغليف لبكتريا *L.reuteri* وذلك حسب البحوث والرساات السابقة عن طريق مزج (5-2.50) غم من الصمغ العربي مع (5-15)غم من شرش حليب الجاموس المجفف و(1-5)مل من

البكتريا المنشطة في الفقرة (3-2-6) والتي احتوت على (لوغارتم 11.74 ± 0.21 وحدة تكوين مستعمرة/مل) ، وبمحتوى صلب كلي بلغ 7-20% باستعمال الماء المقطر وحسب النسب المبينة في الجدول (3-4). واتبعت الطريقة المذكورة من قبل (Puttarat et al. (2021)، اذ مزجت محاليل التغليف لمدة 30 دقيقة على 250 دورة/دقيقة باستعمال المازج المغناطيسي، ثم حفظت على درجة حرارة 4 م لمدة 12 ساعة، بعدها عدل الاس الهيدروجيني للمحاليل الى 7.5 باستعمال NaOH ثم سخنت عند 90 م لمدة 10 دقائق مع التحريك المستمر على 250 دورة/دقيقة، بعدها برد الخليط الى درجة حرارة المختبر واضيف مقدار قليل من الصمغ العربي ثم التجانس عند 12000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق لتحقيق الاستقرار في الحالة الغروية. بعد ذلك تمت اضافة محلول البكتريا النشطة (لوغارتم 11.74 ± 0.021 وحدة تكوين مستعمرة/مل) وخلطه بلطف للحصول على تغليف خلية نهائي لا يقل عن 10.53 ± 0.51 وحدة تكوين مستعمرة/مل.

3-2-8 دراسة ظروف جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven .

جففت العينات باستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ عند ضغط (300 و 400 و 500 و 600) ± 50 ملي بار ودرجة حرارة (40 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70 و 80) ± 5 م لتثبيت ظروف العمل للجهاز . ولفترات زمنية (1 و 3 و 5) ساعة ± 5 دقيقة. حيث اضيفت 10 مل من البكتريا المنشطة (لوغارتم 11.74 ± 0.021 وحدة تكوين مستعمرة/مل) ومزج مع 90 مل من المحلول الذي يحتوي على صمغ عربي وشرش حليب الجاموس المجفف (Haldar and Gandhi. 2020).

3-2-9 عملية التغليف.

ادخلت محاليل البكتريا المغلفة الى جهاز التجفيف Vacuum oven لغرض الحصول على افضل غلاف لنمو البكتريا. ثم حفظت العينات المغلفة بالتبريد لحين الاستعمال .

جدول (3-4) نسب المواد الداخلة في تغليف بكتريا *L.reuteri* .

Run	Bacterial inoculum (ml)	Arabic gum	Whey (gm)	Bacteria number logarithm	Percent%
1	5.00	5.00	5.00	7.46	63.54
2	5.00	5.00	15.00	7.39	62.94
3	5.00	3.51	11.00	8.16	69.50
4	5.00	2.50	5.00	7.46	63.54
5	5.00	4.51	11.00	7.76	66.09
6	1.00	4.13	15.00	8.63	73.50
7	1.00	5.00	5.00	7.46	63.54
8	1.00	4.18	9.45	8.16	69.50
9	1.00	2.50	8.55	8.16	69.50
10	2.62	3.50	5.00	7.60	64.73
11	2.62	5.00	10.95	8.60	73.25
12	2.20	3.25	12.00	8.95	76.23
13	3.58	2.50	15.00	8.16	69.50
14	3.36	4.11	15.00	7.06	60.13
15	3.28	2.50	8.30	7.50	63.88
16	3.00	4.75	5.95	8.41	71.63

10-2-3 دراسة صفات المسحوق المجفف

1-10-2-3 تقدير الرطوبة النسبية

تم تقدير النسبة المئوية للرطوبة باستعمال فرن تجفيف كهربائي (oven) نوع Memmert ألماني الصنع اذ وزن 5غم من مسحوق البكتريا المغلفة وجففت على حرارة 105م لحين الحصول على وزن ثابت، وقيس وزن المادة الجافة الناتجة وطرح من الوزن الكلي (A.O.A.C,1994).

$$\text{الرطوبة \%} = \frac{\text{وزن العينة مع الطبق قبل التجفيف} - \text{وزن العينة مع الطبق بعد التجفيف}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

3-2-10-2 تقدير العدد الكلي لبكتيريا القولون Total Coliform bacteria:

حسبت اعداد بكتيريا القولون وباستعمال وسط MacConkey Agar (MA) وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م ولمدة 48 ساعة، استعمل هذا الاختبار للبكتيريا المغلفة خلال مرحلة التحضير وفترات الخزن.

3-2-10-3 دراسة التغير الحاصل في الأعداد الحية لبكتيريا *L.reuteri* المغلفة بعد التجفيف وخلال مدة الخزن.

درس التغير الحاصل في الاعداد الحية للبكتيريا *Limosilactobacillus reuteri* المغلفة بعد التجفيف وخلال مدة الخزن البالغة (6) اشهر والمدد التي بدأت من الصفر(يوم) الذي يمثل أعداد البكتيريا الحية بعد نهاية التجفيف فضلا عن الأوقات 1، 2، 3، 4، 5، و6 اسابيع من الخزن في درجة حرارة 4 و25 م. باستعمال طريقة الصب اذ زرع 1مل من التخافيف العشرية وصب وسط MRS agar المحضر في الفقر(3-1-4-2) وحضنت الاطباق بدرجة 37م لمدة 48 ساعة واستعملت هذه الطريقة قبل وبعد عملية تجفيف البكتيريا(Speak.,1984).

3-2-10-4 تقدير كفاءة التغليف وإنتاجية المسحوق.

اتعبت الطريقة التي ذكرها (Puttarat et al.,2021) ، اذ اذيب غرام واحد من البكتيريا المغلفة في 10 مل من PBS (0.1 مولاري، واس هيدروجيني 7.2) مع التحريك لمدة 20 دقيقة لتحرير الخلايا البكتيرية. اجري سلسلة من التخافيف العشرية وزرعت على وسط MRS agar، وحضنت لاهوائياً عند 37° لمدة 48 ساعة. تم حساب النسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف باستعمال المعادلة التالية (Eckert et al., 2017):

$$\text{Microencapsulation efficiency (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

اذ ان N هو اعداد البكتيريا الحية المغلفة بعد التجفيف و/ N₀ هو اعداد البكتيريا الحية في محلول التغليف قبل التجفيف.

بعد عملية التجفيف، تم قياس كتلة المسحوق الجاف لحساب النسبة المئوية لإنتاجية المسحوق حسب

المعادلة:

$$\text{Powder yield (\%)} = (M/M_0) \times 100$$

اذ ان M هي كتلة المسحوق الجاف و / M₀ هي كتلة المواد المغلفة المستعملة.

3-2-10-5 تشخيص المظهر الخارجي وتقدير كثافة العناصر المكونة للغلاف باستعمال تقنية (SEM-

Scanning electron microscopy- Energy- dispersive X-ray (EDS spectroscopy

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Sun *et al.*(2017) لدراسة المظهر الخارجي للبكتريا المغلفة

باستعمال تقنية SEM-EDS، اذ تم تجميد 50 ميكرو لتر من خلايا البكتريا المغلفة عند -80° م لمدة 4

ساعات ثم تم تجفيفها بالتجميد باستعمال مجفف التجميد-Christ ALPHA 1-2 LD plus freeze-

dryer (Martin Christ, GmbH, Germany). وبعد عملية التجفيف بالتجميد، تم نقل الخلايا

بحذر تام إلى جداول الكربون الموصل (Ted Pella; Redding, CA, USA). اذ تم طلاء العينات

بالذهب باستعمال طلاء Hitachi E-1045 (Hitachi High-Tech Science Corp., Japan)

لمدة 90 ثانية (اذ تساعد رقائق الذهب هذه في توصيل الإلكترونات التي تصل إلى سطح المادة، مما يساهم

في الحصول على صورة خالية من التداخل ذات جودة ودقة أفضل). لغرض الفحص بالمجهر الإلكتروني

وتم فحصها باستعمال مجهر إلكتروني SEM لمسح الانبعاثات مزود بمطياف مشتت الطاقة بالأشعة السينية

(Horiba Ltd.,UK) HORIBA 7593-H وبجهد الكتروني مسلط بلغ 15 كيلو فولت وبقوة

تكبير 200 نانومتر على مساحة عمل بلغت 5.54 ملمتر. تم ضبط مسافة عمل EDS على 15 mm، بينما

تم ضبط وقت الحصول على البيانات على 300 ثانية، وبسرعة 2000 cps .

3-2-11 التجربة المختبرية

3-2-11-1 تقدير مستعمرات بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* المغلفة في سوائل الجهاز الهضمي المختبري (الفم والمعدة والاثني عشري واللفائفي).

نفذت التجربة المختبرية لمحاكاة الجهاز الهضمي لتقييم بقاء البكتريا المعزلات الحيوية كما وصفها (Madureira et al., 2011)، مع بعض التحويرات. اذ اخذت ثلاث حجوم متساوية بوزن 1غم من البكتريا المغلفة واضيف اليها 9مل من ماء البيبتون المعقم (تحتوي على لوغارتم 9.12 وحدة تكوين مستعمرة/غم) لمرحلة الهضم في الفم والمعدة والاثني عشري واللفائفي وقورنت العينات مع البكتريا غير المغلفة بإضافة 1مل منها الى 9 مل من ماء البيبتون المعقم (تحتوي على لوغارتم 0.021 ± 11.74 وحدة تكوين مستعمرة/مل). نفذت التجربة في داخل حاضنة هزاز (Shaker incubator; kottermann, Germany) على 37م لمحاكاة درجة حرارة جسم الانسان والهضم الميكانيكي وحركة الامعاء التمعجية خلال مراحل الهضم.

بلغ وقت محاكاة الهضم في الفم 5 دقيقة (تحويل دقيقتان) على 200 دورة/دقيقة واس هيدروجيني 6.9 لمحاكاة حموضة الفم. بعدها استمرت نفس العينة الى مرحلة الهضم في المعدة على 150دورة/دقيقة(تحويل 130) مع إضافة 0.05 مل من انزيم الببسين(350ملغم/100مل ماء مقطر) في كل مرة يتغير فيها الاس الهيدروجيني و بلغ وقت المحاكاة فيها 90 دقيقة وهي مقسمة كالتالي (10 دقائق عند اس هيدروجيني 5.5 و 10 دقائق عند اس هيدروجيني 4.6 و 10 دقائق عند اس هيدروجيني 3.8، و 20دقيقة عند اس هيدروجيني 2.8 و 20 دقيقة عند اس هيدروجيني 2.3 و 20 دقيقة عند اس هيدروجيني 2.0). بعدها استمرت العينة الثانية الى مرحلة الهضم في الاثني عشري اذا بلغ وقت المحاكاة فيها 20 دقيقة بوجود 0.125 مل من املاح الصفراء البقري و 0.125 مل من البنكرياتين على 45 دورة/دقيقة مع تعديل الاس الهيدروجيني الى 5.0 . بعدها استمر عملية الهضم الى مرحلة الهضم في اللفائفي على اس

هيدروجيني 6.5 و 45 دروة/دقيقة وبوقت بلغ 90 دقيقة بوجود 0.125 مل من املاح الصفراء البقري (المحضرة بتركيز 0.6% وزن/حجم حسب (Soltani Lak et al.,(2021) و 0.125 مل من البنكرياتين (المحضرة بتركيز 0.2% وزن/حجم حسب (Soltani Lak et al.,(2021) .

في نهاية كل مرحلة هضم تم إزالة الدورق الزجاجي المقابلة لها و بعد عمل التخفيف العشرية لها اخذ 1 مل من العينة وزرعت على وسط MRS agar والحضن على درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة .بعدها يتم حساب اعداد المستعمرات البكتريا الحية وضربها في مقلوب التخفيف. تمت المقارنة مع عينة السيطرة التي تحتوي على البكتريا غير المغلفة. حضر مسبقا محلول حامض الهيدروكلوريك المركز HCl بتركيز (1) مولاري ومحلول بيكاربونات الصوديوم NaHCO_3 بتركيز (1) مولاري وتعقيمهما لضبط الاس الهيدروجيني للعينات خلال مراحل محاكاة الجهاز الهضمي. (تحويل تمت اضافة 0.2غم من الكيموتريسين في مرحلة الهضم في الامعاء). تم تخزين الإنزيمات المستخدمة تحت التجميد قبل الاستعمال بدرجة (-18م). تم تحضير جميع المحاليل في وقت الاستعمال وتعقيمهما بغشاء (MF-Millipore™) ذو حجم مسامي (pore) 0.22 ميكرومتر وقطرها 47 ملم. (Biohazard, Germany).

3-2-11-2 اختبار مقاومة البكتريا المغلفة ضد أملاح الصفراء

اتعبت طريقة (Lin et al.(2007) للكشف عن مقاومة غلاف بكتريا *Limosil.reuteri* بالمقارنة مع العينات التي لا تحتوي على املاح الصفراء واخرى تحتوي على البكتريا الحرة(غير المغلفة) بوجود املاح صفراء، حضر وسط النمو MRS Broth المضاف اليه املاح الصفراء البقري (Oxgall bile B8381,Sigma) بتركيز 0.1 و 0.3 و 0.5% (وزن/حجم). تم اضافة 1% من البكتريا الى الوسط المحضر.بعدها حضنت العينات لمدة 4 ساعات على درجة حرارة 37م°. وزرعت على وسط MRS الصلب ثم حسبت اعداد البكتريا وضربت بمقلوب التخفيف.

3-11-2-3 اختبار مقاومة البكتريا المغلفة اتجاه التغير في الاس الهيدروجيني ودرجات الحرارة.

اتبعت الطريقة التي وصفها Matos-Jr *et al.*(2019) لتحديد كفاءة مقاومة غلاف البكتريا بعد التعرض للحرارة وظروف الأس الهيدروجيني مع تعديلات طفيفة. بالنسبة للتغير في درجات الحرارة، اخذت (1غم) من البكتريا الحرة غير المغلفة و(1غم) من البكتريا المغلفة بشكل منفصل واضيف اليها 10 مل من (PBS M 0.1، عند اس هيدروجيني 7.2) وتم تسخينها عند 45° و 63°م لمدة 30 دقيقة باستعمال حمام مائي. بعدها تم التبريد إلى درجة حرارة 25°م مباشرة. اما بالنسبة للتغير في ظروف الأس الهيدروجيني، اخذت (1غم) من البكتريا الحرة غير المغلفة و(1غم) من البكتريا المغلفة بشكل منفصل واضيف اليها 10 مل من (PBS M 0.1، عند اس هيدروجيني 7.2) وعدل الاس الهيدروجيني باستعمال 1مولاري من حامض الهيدروكلوريك و1عباري من هيدروكسيد الصوديوم عند اس هيدروجيني 3.0 و 6.0 و 9.0. بعدها حضنت جميع العينات عند 37° لمدة 30 دقيقة.

ثم زرعت عينات اختبار الحرارة والحموضة بعد عمل سلسلة تخفيف منها على وسط MRS agar وحضنت لاهوائياً عند 37° لمدة 48 ساعة وحسبت اعداد مستعمرات البكتريا وضربت بمقلوب التخفيف. تم استعمال العينة غير المغلفة للمقارنة (Control).

3-2-12-2-3 تدعيم اللبن الرائب باستعمال البكتريا العلاجية المغلفة

3-12-2-3-1 بكتريا البادئ

تم تنشيط بكتيريا البادئ المتكون من انواع *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* والمجهزة من مختبرات شركة Sasco الايطالية وبنسب (1:1) باستعمال الحليب الفرز معقم على درجة حرارة (110م لمدة 5 دقائق) ثم برد الى درجة حرارة 40 م واضيف بمقدار 0.2 غم لكل 100 مل حليب الفرز ثم مزج جيداً وحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، كررت العملية ثلاث مرات ثم

أخذ 1غم من المزرعة الأم وأضيف إلى 99 مل من الحليب الفرز المعقم وحضن على درجة حرارة 37 م ولحين حدوث التخثر بعدها حفظت العينات في الثلاجة لحين الاستعمال اليومي.

3-2-12-1-1 طريقة تصنيع اللبن الرائب المدعم ببكتريا *limosilactobacillus reuteri* المغلفة

صنع اللبن الرائب بتسخين حليب الاغنام الطازج إلى درجة حرارة 2 ± 90 م ولمدة 5 دقيقة ثم برد إلى

درجة حرارة 42 م واضيف بادئ اللبن الرائب المحتوي على بكتريا *Lactobacillus bulgaricus*

و *Streptococcus thermophiles* بمقدار 3% (يحتوي على عدد 10^9 وحدة تكوين مستعمرة/غم) ، ثم

وزع الحليب في علب بلاستيكية سعة 100مل مع اضافة البكتريا *L.reuteri* المغلفة للمعاملة T1(تحتوي

على تركيز 1% من البكتريا المغلفة) و T2(تحتوي على تركيز 3% من البكتريا المغلفة) و T0(تحتوي

على بكتريا حرة غير مغلفة) و Tc (تحتوي على بادئ عينة اللبن الرائب فقط) واغلقت بأحكام ثم حضنت

بدرجة حرارة 37 م لحين وصول الاس الهيدروجيني 0.2 ± 4.6 ، ثم اخرجت العينات وحفظت بدرجة حرارة

الثلاجة لمدة 21 يوم. واجريت الاختبارات اللاحقة عند 1 و7 و14 و21 يوم من الخزن (Shwetnisha and

Nongmaithem,2021).

3-2-12-2-3 الاختبارات البكتريولوجية والفيزيوكيميائية والحسية للبن الرائب

3-2-12-2-3 حساب اعداد مستعمرات بكتريا *Limosilactobacillus reuteri*

حضرت سلسلة من التخفيف العشرية لعينات اللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة ثم زرع 1 مل

من اخر تخفيفين وصب عليه وسط MRS-T agar المحضر في الفقرة(3-2-2) وحضنت تحت ظروف لا

هوائية بدرجة حرارة 37م ولمدة 24 ساعة وحسبت اعداد البكتريا النامية مضروبة في مقلوب

التخفيف (Jannah et al.,2018).

3-2-12-2-3 حساب اعداد مستعمرات بكتريا حامض اللاكتيك

استعمل وسط MRS-agar المحضر في الفقرة (3-4-1-2) في حساب اعداد بكتريا ثم حضنت تحت ظروف لا هوائية بدرجة حرارة 37م ولمدة 48 ساعة وحسب اعداد البكتريا النامية مضروبة في مقلوب التخفيف (Lima et al.,2009).

3-2-12-2-3 حساب اعداد مستعمرات بكتريا القولون

اتبعت طريقة الصب لحساب اعداد بكتريا القولون وكما ورد في الفقرة (3.8.2.3).

3-2-12-2-3 حساب اعداد مستعمرات بكتريا Staphylococci

استعمل الوسط المحضر في الفقرة (3-4-1-5) لتقدير اعداد مستعمرات بكتريا *Staphylococcus aureus* وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة و بعدها يتم حساب اعداد المستعمرات النامية ذات اللون الذهبي (Watts,2005).

3-2-12-2-3 قابلية ربط الماء (WHC) Water holding capacity

قدرت قابلية ربط الماء لعينات اللبن الرائب حسب طريقة (Shori et al. (2014)، اذ وزن 10 غم من اللبن الرائب وطرد مركزيا على 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم وزن الراشح وحسبت قابلية ربط الماء من خلال المعادلة ادناه:

$$WHC\% = [1 - \frac{w1}{w2}] \times 100$$

حيث ان $w1$ = تمثل وزن الراشح بعد اجراء عملية الطرد المركزي و $w2$ = تمثل وزن عينة اللبن

الرائب .

3-2-12-2-3 قابلية نضوح الشرش (STS) Susceptibility to Syneresis

قدرت قابلية نضوح الشرش لعينات اللبن الرائب بوضع 10 مل من العينة على ورق ترشيح (Whatman NO.1) وحسب حجم الشرش النازل بعد مرور 6 ساعات بواسطة اسطوانة مدرجة وطبقت المعادلة ادناه لحساب نسبة نضوح الشرش وحسب طريقة (Niamah et al.,2016).

$$STS\% = [1 - \frac{V1}{V2}] \times 100$$

حيث ان $V1$ = تمثل حجم الشرش النازل. و $V2$ = تمثل حجم عينة اللبن الرائب .

7-2-12-2-3 تقدير الحموضة الكلية% والاس الهيدروجيني

قدرت الحموضة الكلية% والاس الهيدروجيني لعينات اللبن الرائب المتخمر المضاف له البكتريا المغلفة بنسب مختلفة وحسب طريقة (Nielsen,2010) الواردة في الفقرة (3.2.3).

8-2-12-2-3 الفحوصات الحسية Sensory tests

استعملت استمارة التقييم الحسي المبينة في جدول (5-3) في تقييم اللبن الرائب الحاوي على المعززات الحيوية والمضاف اليه البكتريا بتراكيز (3،1،0)% و قيمت النماذج من قبل اساتذة قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة (الشريفي، 2017).

جدول (5-3) استمارة التقييم الحسي

الصفات						درجة التقييم
المجموع العام	التقبل العام	النسجة	القوام	النكهة/ الطعم	اللون	
100	20	10	20	30	20	رمز المعاملة
						A
						B
						C
						D

13-2-3 التجربة الحيوانية

أجريت هذه التجربة في البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري/جامعة البصرة للفترة من 2023/6/25 ولغاية 2023/9/1 (68 يوم). تم استعمال 24 ذكر من الجرذان المختبرية نوع البينو (*Rat albino*) ذات اللون الابيض بعمر 75-100يوم. بمتوسط وزن 120-150 غم لكل حيوان والتي تم تجهيزها من كلية الطب البيطري/جامعة البصرة. تضمنت الدراسة فترة تأقلم الحيوانات والتي استمرت 7 ايام

بتغذية العليقة الطبيعية دون تجريع ، واستمر التجريع حتى نهاية التجربة لمرة واحدة في اليوم بمقدار 2مل لكل حيوان من اللبن الرائب المصنع في المختبر والملح بتركيز (3,1,0)% من البكتريا المغلفة *L.reuteri* مع وجود عينة مقارنة لم يتم تجريعها باللبن الرائب. واجريت الفحوصات البايوكيميائية للحيوانات كل 7 ايام بسحب الدم من قلب الحيوان مباشرة وتحليلها في مختبر Bio-Vet /محافظة البصرة.

3-2-13-1 إدارة الحيوانات:

تم توزيع الجرذان عشوائياً على اربع معاملات، بواقع 6 مكررات لكل معاملة ، وفقاً للتصميم الكامل العشوائي CRD. كانت الجرذان في حاويات بلاستيكية مغطاة بمشبك حديدي بأبعاد 75 × 70 × 45 سم طولاً وعرضاً وارتفاعاً على التوالي، وفرشت ارضية الحاويات بنشارة الخشب النظيفة لفرش ارضية الاقفاص بسمك 3 سم وتغير هذه النشارة كل 4 ايام ، ثم وضعت الحاويات على رفوف ذات ثلاث طوابق وارتفاع 70 سم من الأرضية بانتظام داخل القاعة لغرض توفير درجة الحرارة في حدود (27±2م). تم اعتماد التهوية باستعمال مراوح شفاط تم تركيبها في أعلى جدران قاعة التجربة، واستعمل نظام الإضاءة المستمر لمدة 12 ساعة. تم استعمال ابر طبية 5 مل لكل قفص موصولة بانبوبة تجريع ، عند تجريع الحيوانات لمرة واحدة كل يوم. تم توفير مياه الشرب باستعمال الطريقة الأوتوماتيكية التي تحتوي على حلقة معدنية ويتم رفعها تدريجياً إلى مستوى الحيوان ليعود إلى تسهيل عملية شرب الماء حتى نهاية التجربة. تمت تغذية الحيوانات بالعليقة خلال الاسبوع الاول من التجربة دون تجريع في حين استمر التجريع من اليوم السابع حتى نهاية التجربة. واستعملت العليقة القياسية في تغذية الحيوانات طوال فترة التجربة والتي تحتوي على المكونات المدرجة في

الجدول ادناه. جدول(3-6) مكونات العليقة المستعملة في تغذية الجرذان

المكونات	غم / 100 غم
الحنطة	32
الشعير	20
الذرة	20
بروتين حيواني	10
دهن حيواني	7
حليب مجفف	10
ملح	1

3-2-13-2 تصميم الدراسة: -

تم في الدراسة استخدام 24 ذكر من الجرذان بعمر شهرين، بمتوسط وزن أولي تراوح بين 122-150 غم، تم توزيع الحيوانات عشوائياً على 4 معاملات بواقع 6 مكررات لكل معاملة. يتم تصنيف المعاملات اعتماداً على تركيز بكتريا *L.reuteri* المغلفة لمدة 60 يوماً تقريباً على النحو التالي:

- 1- مجموعة (Tc): تمثل مجموعة الحيوانات التي تناولت العليقة القياسية فقط.
 - 2- مجموعة التركيز 0%(Tf): تمثل مجموعة الحيوانات التي جرعت اللبن الرائب المحتوي على البكتريا غير المغلفة.
 - 3- مجموعة التركيز 1%(T1): تمثل مجموعة الحيوانات التي جرعت اللبن الرائب المحتوي على البكتريا المغلفة بوزن 1غم لكل 100 مل لبن رائب.
 - 4- مجموعة التركيز 3%(T3): تمثل مجموعة الحيوانات التي جرعت اللبن الرائب المحتوي على البكتريا المغلفة بوزن 3غم لكل 100 مل لبن رائب.
- تم حساب وزن الجسم واستهلاك العلف يومياً. تم جمع عينات الدم كل 7 ايام من التجربة للتحليل الفيزيائي والكيميائي الحيوي. تم التضحية بخمس حيوانات من كل دراسة مكررة لصفات الأمعاء (وزن الكبد والكليتين والتقطيع النسيجي للأمعاء).

3-2-13-3 جمع العينات

منعت الجرذان من الطعام لمدة تقارب 12 ساعة (Fasting) ثم خدرت باستعمال 0.1 مل/20غم B.W.IP من مادة (87.5 ملغم/كلغم Ketamine مع 12.5 ملغم/كلغم Xylazine) عن طريق حقنها داخل الصفاق والانتظار لفترة 3-5 دقائق (Aledani et al.,2020).

3-2-3-13-1 عينة الدم:

تم جمع عينات الدم من الجرذان من القلب مباشرة باستعمال Syringe حجم 5 مل بعد كل 7 ايام من عمر التجربة بواقع 4 عينات (عينة واحدة من كل مجموعة) بمعدل 0.5 مل من الدم لكل عينة، ووضعها في أنابيب تحتوي على مانع التخثر (EDTA) Ethyl diamine tetra acetic acid. لتقدير بعض الخصائص الخلوية و0.5 مل من كل عينة تم وضعها في أنابيب خالية من مضادات التخثر لتقدير بعض المعايير الكيموحيوية للمصل. تم وضع الأنابيب البلاستيكية الخالية من مضادات التخثر وتحتوي على 1 مل من الدم في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لفصل مصل الدم وحفظه عند درجة حرارة -20° حتى انتهاء الاختبارات.

3-2-3-13-2 العينة المعوية:

تم فتح التجويف البطني من اسفل البطن وحتى البلعوم وتحضير مقاطع من ثلاث مناطق من الأمعاء الدقيقة (الاثني عشر، الصائم واللفائفي) وحفظها منفصلة عن بعضها البعض باستعمال الفورمالين 10% مولاري في حافظات سعة 100 مل وحفظت في الثلجة لغرض دراسة الخصائص النسيجية.

3-2-3-13-4 الخصائص المدروسة:

3-2-3-13-4-1 سمات النمو

خلال فترات التجربة تم تسجيل وزن الجسم وزيادة الوزن واستهلاك العلف ونسبة التحويل الغذائي أسبوعياً.

3-2-3-13-4-1-1 متوسط وزن الجسم (غم):

تم وزن الجرذان بشكل فردي أسبوعياً لكل معاملة تجريبية مختلفة ابتداءً من اول يوم للتجربة بوزن أولي 120-150 غم وحتى نهاية التجربة وحسب المعادلة التالية (الوزن النهائي - الوزن الاولي)/عدد الايام (الفياض وناجي، 1989).

3-2-13-4-1-2 زيادة الاوزان الأسبوعية (غم):

حسبت الزيادة الوزنية وفق المعادلة التالية لكل مكرر (الفياض وناجي، 1989):

زيادة الوزن = متوسط وزن الجسم الحي في نهاية الأسبوع - متوسط وزن الجسم الحي في بداية الأسبوع.

3-2-13-4-1-3 نسبة تحويل العلف (غم/غم):

نسبة التحويل الغذائي = كمية العلف (غم) / زيادة الوزن (غم) (Awadh,2020)

3-2-13-4-1-4 دراسة التغيرات الحاصلة في أوزان الكبد والكليتين

فتح التجويف البطني من اسفل البطن وحتى البلعوم لاستئصال الكبد والكليتين وتم وزنهما بعد فصلهما

عن الجسم باستعمال ميزان حساس.

3-2-13-4-2 الصفات الفسيولوجية:

3-2-13-4-1-2 الخصائص الخلوية للدم:

تم إجراء تحليل اختبارات الدم في مختبر Bio-Vet البيطري على النحو التالي:

3-2-13-4-1-2-1 تقدير عدد خلايا الدم الحمراء (RBC) الكلي.

استعملت شريحة الهيموكيتومتر hemocytometer لحساب عدد خلايا الدم الحمراء (RBC). ووفقاً

للطريقة التي ذكرها Al-Hasani and D. (2000) بعد عملية الإضافة مباشرة تم حساب العدد الإجمالي

لكريات الدم الحمراء وفق المعادلة التالية:

$$\text{إجمالي عدد خلايا الدم الحمراء} = \text{عدد خلايا الدم الحمراء في خمسة مربعات} \times 10000$$

3-2-13-4-1-2-2 تقدير عدد خلايا الدم البيضاء (WBC) الكلي:

تم استعمال الطريقة المباشرة لحساب عدد خلايا الدم البيضاء باستعمال شريحة الكريات الدموية. حيث

يتم سحب الدم إلى العلامة 0.5 ومن ثم يتم استكمال الحجم إلى العلامة 11 باستعمال محلول التخفيف حسب

Campbell.(1995) وهذا يخفف الدم إلى 20 مرة وبعد خلط محلول الدم(محلول التخفيف يتم مزجه جيداً)

ومن ثم يتم وضع قطرة من الخليط المخفف فوق تجويف جهاز قياس الدم ثم حساب أعداد خلايا الدم البيضاء

المصبوغة باللون الأزرق الداكن، فقد تظهر بشكل حبيبي. واستعملت المعادلة التالية لحساب كريات الدم البيضاء (Al-Daradji et al., 2008). حيث يتم استعمال مربعات خلايا الدم البيضاء وفحصها تحت المجهر واستخراج العدد الإجمالي.

عدد خلايا الدم البيضاء (1000 خلية / ملم³) = إجمالي عدد الخلايا في 9 مربعات + (10% من إجمالي عدد خلايا الدم البيضاء) × 200

3-4-13-2-3 الاختبارات البيوكيميائية:

1-3-4-13-2-3 تركيز الكلوكوز:

تم قياس نسبة الكلوكوز في الدم باستعمال مجموعة مقدمة من الشركة الفرنسية (BIOLABO). تم إجراء التحاليل بناءً على الخطوات المبينة من قبل الشركة وباستعمال جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 550 نانومتر. ومن ثم تم قياس الامتصاصية لكل عينة، ثم تم تطبيق المعادلة التالية:

كلوكوز الدم (ملغم/100 مل) = عينة الامتصاص / محلول الامتصاص القياسي × 100 (Coles, 1986).

2-3-4-13-2-3 قياس نشاط إنزيم AST

تم قياسه باستعمال مقياس الطيف الضوئي عند طول موجي 505 نانومتر، وتم استخلاص نشاط AST (وحدة دولية/مل) باستعمال منحنى قياسي تم إعداده لهذا الغرض.

3-3-4-13-2-3 قياس نشاط إنزيم ALT

تم قياسه باستعمال مقياس الطيف الضوئي عند طول موجي 505 نانومتر، وتم استخلاص نشاط ALT (وحدة دولية/مل) باستعمال منحنى قياسي تم إعداده لهذا الغرض.

4-4-13-2-3 الخصائص المعوية

1-4-4-13-2-3 الدراسة النسيجية:

أخذت عينات من الأمعاء (الاثني عشر والصائم واللفائفي) بعد قتل الجرذان في نهاية التجربة ووضعت في أنابيب تحتوي على الفورمالين بتركيز 10% لغرض حفظ الأنسجة لحين إجراء المقاطع

النسيجية والتي أجريت ابتداءً بتمرير قطع صغيرة من العينات بتركيز مختلفة من الكحول الإيثيلي (70، 80، 90، 100%) لغرض سحب الماء من الأنسجة، ثم تمت تصفيتها بعد إزالة الماء منها باستعمال الزايلين النقي الذي يجعل الأنسجة شفافة ويمكن إزالتها بسهولة أثناء عملية التقليل. تم تثبيت شرائح ميكروتوم Microtom بسماكة 5 ميكرون على شرائح زجاجية، وتم تمريرها بعد ذلك بتركيزات مختلفة من الكحول الإيثيلي (100، 90، 80، 70%) ومصبوغة بالهيماتوكسيلين hematoxylin والأيوسين Eosin. بعد تحضير المقاطع النسيجية، أصبحت جاهزة للفحص المجهرى (Hair-Bejo, et al., 2000).

3-2-13-4-4-1 الفحص النسيجي (Histological)

ثم اخذ مقطع من الصائم بواقع 2 سم، ووضع الجزء الماخوذ في علب بلاستيكية محكمة الغلق تحتوي على مادة الفورمالين بتركيز 10% وتم اجراء عمليات الفحص النسيجي وفق الخطوات التالية (Gallaher et al., 1996):-

1- بعد ان تم اخذ مقطع من الصائم بطول 2 سم يغسل عدة مرات بالماء المقطر للتخلص من جميع الفضلات ويحفظ في الفورمالين بتركيز 10%.

2- قبل تقطيع النسيج تم اجراء خطوة تحضيرية وهي امرار النسيج بتركيز مختلفة من كحول الايثانول وبتراكيز تصاعدية ابتداء من 50% الى 100% وتستمر هذه الخطوة لمدة ساعة في كل تركيز.

3- تليها عملية ترويق الانسجة للتخلص من الماء الموجود داخلها ويتم باستعمال مادة Xylene لمدة ساعتين لكل مكرر فرديا.

4- بعدها يتم وضع الانسجة في شمع البرافين (Paraffin) وتعريضها الى درجة حرارة 60-65م ويتم ذلك باستعمال فرن ولمدة ثلاث ساعات بهدف تشبعها بالشمع بعدها توضع الانسجة مع الشمع في قوالب شمعية مكعبة الشكل وإزالة المتبقي بعد عملية التجميد.

5- عملية التقطيع وتتم بتقطيع أنسجة الصائم باستعمال جهاز التقطيع (microtom) بأخذ القطع بسماك 5 مايكرون لكل شريحة.

6- تتم هذه الخطوة باستعمال حمام مائي لغرض تسهيل عملة الفرش على الشرائح الزجاجية ويستعمل لتثبيتها خليط من الالبومين والفينول وبعد التثبيت تترك لتجف.

7- ازالة الشمع كليا من الشرائح باستعمال فرن بدرجة حرارة 70-80م ولمدة 20 دقيقة.

8- التصبيغ ويمكن ايجاز خطواته كما يلي:-

أ. توضع الشرائح بتراكيز من الايثانول (80-90-100)% ولمدة 3 دقائق في كل تركيز ولكل عينه فرديا.

ب. بعدها توضع في صبغة الهيماتوكسلين باستعمال وعاء التصبيغ ولمدة 5 دقائق تليها عملية الغسل باستعمال ماء الحنفية ولمدة 4 دقائق.

ت. تغمر بعدها بصبغة اليوسين بتركيز 1% لمدة دقيقة واحدة ثم تغمر بماء الحنفية دقيقة واحدة.

ث. الخطوة الاخيرة تتم بتمرير الشرائح بتراكيز تصاعديّة من الكحول الاثليلين (80-90-100)% ولمدة دقيقة واحدة وبعدها يتم اخراجها وتجفيفها من الكحول ووضع عليها غطاء شريحة ويتم تثبيتها بوساطة (Canada Balsam) عند نهاية هذه الخطوة تعد الشرائح جاهزة لقياس طول الزغابة وعمق الخبايا ويتم ذلك باستعمال المجهر الضوئي.

3-2-4-4-2-13-2-4-2 قياس طول الزغابة وعمق الخبايا:

تم قياس طول الزغابات وعمق الخبايا لمقاطع الأنسجة المحضرة من ثلاث مناطق من الأمعاء الدقيقة: الاثني عشر والصائم واللفائفي باستعمال المجهر الضوئي وباستعمال عدسة عينية 100x بعد معايرتها بميكرومتر مقياس المرحلة. ويقدر طول الزغب من أعلى الزغب إلى ارتباطه بالخبايا (Shamoto and yamauchi.,2000). وكذلك عمق الخبايا وهو مسافة انغماس الزغب المجاورة (Uni et

1998)، ويتم قياسه من القاعدة إلى المنطقة الانتقالية بين الخبايا والزغابات (Aptekmann *et al.*, 2001).

3-2-14- التحليل الاحصائي Statistical analysis

استعمل البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) الاصدار 12 وبرنامج Genstat12 في تحليل البيانات وباستعمال التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete Randomized Design وتم تحليل بيانات الاختبارات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي المعدل LSD عند مستوى احتمال ($P \leq 0.05$) (Dean and Voss, 1999). وكذلك استخدمت تجارب عاملية (CRD) (4 x 4) اربع عينات لبن رائب في 4 فترات خزنية للصفات الفيزيائية والكيميائية والميكروبية والانخفاض المايكروبي.

4-النتائج والمناقشة

1-4 المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية لحليب الجاموس والاغنام

يوضح الجدول (1-4) المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية لحليب الاغنام والجاموس، ويلاحظ انخفاض في النسبة المئوية للدهن والمواد الصلبة الكلية وزيادة في النسبة المئوية للرطوبة وهذا يعود إلى نوعية سلالة الحيوان للاغنام والعمر ونوع التغذية ووقت الحلب بالمقارنة مع حليب الجاموس. إما النسبة المئوية للحموضة فهي ضمن الحموضة الطبيعية المعروفة للحليب الطازج. تقاربت هذه النتائج مع *Merlin et al.*, (2015) إذ وجد ان المحتوى الكيميائي لحليب الأغنام بلغ (17.32غم/100غم إجمالي المواد الصلبة، 5.86غم/100غم إجمالي البروتين، 4.46 غم/100 غم بروتينات الكازين، 1.08غم/100غم بروتينات الشرس، 7.28غم/100غم دهون، 0.93غم/100غم رماد، و3.41غم/100غم لاكتوز). وذكر *(Siddiqui et al., 2024)* ان منتجات الالبان المصنوعة من حليب الأغنام المخمرة وغير المخمرة مثل الجبن والزبادي والحليب المحلى والآيس كريم في نمو مستمر بسبب قيمته الغذائية وأنشطته البيولوجية ومحتواه الكيميائي مثل البروتينات (5.6٪، وزن/وزن)، والدهون (6.4٪، وزن/وزن)، ومحتويات أعلى من الفيتامينات والمعادن (0.9٪، وزن/وزن) مقارنة بحليب الأبقار، وستكون حاسمة في دعم الاغذية الوظيفية في المستقبل القريب لتعزيز صحة الإنسان.

بين *Wang et al.*, (2023) ان حليب الجاموس يحتوي على 18.64٪ من المواد الصلبة الكلية و 0.81٪ رماد و 8.30٪ دهون و 4.70٪ بروتين و 4.80٪ لاكتوز و 6.81 اس هيدروجيني و 0.18٪ الحموضة الكلية. مقارنة بحليب الاغنام الذي يحتوي على 18.13٪ من المواد الصلبة الكلية و 0.88٪ رماد و 6.49٪ دهون و 5.30٪ بروتين و 4.77٪ لاكتوز و 6.63 اس هيدروجيني و 1.034 الوزن النوعي، 0.23٪ الحموضة الكلية. يوفر حليب الجاموس ومنتجاته خصائص غذائية وطبية وعلاجية مختلفة لأنه مصدر للبروتينات (4.7٪، وزن/وزن)، والدهون (6.7٪، وزن/وزن)، وحامض الفوليك (60 ميكروغرام/ لتر)، والكالسيوم (205 ملغم/100 مل) مقارنة بحليب البقر (*Abesinghe et al.*, 2020).

اشار (Nayak et al., 2020) ان حليب الجاموس يحتوي على 82.40% محتوى رطوبة و 7.10% دهون و 5% بروتين و 4.60% لاكتوز و 0.90% رماد و 102.30 طاقة (كيلو كلوري). في حين يحتوي حليب الاغنام على 81.60% محتوى رطوبة و 7.30 دهون و 5.70% بروتين و 4.60% لاكتوز و 0.80% رماد و 89.80 كيلو كلوري. ووجد (Luigi et al., 2022) ان حليب الجاموس أغنى من حليب البقر والماعز من حيث إجمالي المواد الصلبة والدهون والبروتين والكربوهيدرات والطاقة المحسوبة والكالسيوم والفوسفور والصوديوم والمغنيسيوم والحديد. كما أن حليب الماعز أغنى بالبوتاسيوم من حليب البقر أو الأغنام.

جدول (1-4) المحتوى الكيميائي والصفات الفيزيائية لحليب الاغنام والجاموس.

الاس الهيدروجيني	الحموضة التسحيحية (%)	النسبة المئوية لمحتويات كل 100غم حليب									مصدر الحليب
		نقطة الانجماد	الكثافة g/cm ³	المواد الصلبة الكلية	المواد الصلبة اللادهنية	رطوبة	رماد	لاكتوز	دهن	بروتين	
6.74	0.11	- 0.57	1.031	18.02	10.04	81.98	0.87	4.38	7.98	4.79	حليب جاموس
6.61	0.13	- 0.63	1.033	17.08	10.21	82.92	0.91	3.45	6.87	5.85	حليب اغنام

2-4 تجفيف شرش حليب الجاموس باستعمال جهاز التجفيف بالرشاد spray drying

بلغت كمية الشرش الناتجة 55.5 غم/لتر من سائل الشرش الحامضي على درجة حرارة مدخلة 150م وبمعدل جريان بلغ 3.5مل/دقيقة للحصول على افضل كمية مجففة من شرش حليب الجاموس من حيث حجم الحبيبات والمظهر، بينما كانت درجة حرارة المخرج 70 م باستعمال جهاز التجفيف بالرشاد spray drying . تقاربت هذه النتائج مع ما توصل اليه (Raquad et al., 2020) اذ استعمل درجة حرارة مدخل لجهاز التجفيف بالرشاد 160 م ودرجة حرارة مخرج 80 م لتجفيف شرش حليب الجاموس المعزول بالطريقة الحامضية والانزيمية والحرارة. في حين استعمل (Kajal et al., 2021) درجة حرارة مدخل 150 م ودرجة حرارة مخرج 65-75 م وبمعدل جريان بلغ 8 مل/دقيقة باستعمال spray drying. الا ان استعمال درجات الحرارة العالية تؤدي الى تدهور البروتينات لذلك فان التحكم في الوقت من الامور المهمة عند استعمال

spray drying. تتميز بروتينات شرش الحليب بمسحوق ناعم ذات لون أبيض وان استعمال هذه الطريقة تعطي افضل النتائج وكمية بروتين عالية مقارنة بطريقة التجفيف بالتجميد Freeze Drying بسبب ارتفاع نسبة البروتينات (Raquad et al.,2020).

تحتوي بروتينات الشرش على أكثر من 31.5 % من الأحماض الأمينية القطبية المحبة للماء والأحماض الأمينية القطبية الكارهة للماء. وهي تلعب دورًا مهمًا وحاسمًا في ربط المياه (Damodaran et al.,2017). ويتميز التجفيف بالرذاذ spray drying بإزالة الماء بحدود 96% ويعمل على تفتيت التراكيب الحلزونية ألفا التي تؤدي إلى تكوين لفائف عشوائية. وبالتالي، فإنه سيتم تعزيز β -sheet لتكوين تشابك مع التحكم في الوسط الحامضي وان درجة الحموضة للبروتين تعد أحد العوامل الخارجية التي تؤثر على إنتاج الهلام (Nishanthi et al.,2017).

3-4 تقدير العدد الكلي للبكتريا العلاجية *Limosilactobacillus reuteri* قبل التغليف

بلغت اعداد بكتريا (*L.reuteri*) *Limosilactobacillus reuteri* النشطة قبل عملية التغليف لوغارتم 11.74 ± 0.21 وحدة تكوين مستعمرة/مل على وسط MRS الصلب. وتتفق هذه النتائج مع Rodrigues et al.,(2022) اذ استعمل تركيز لوغارتم 9 وحدة تكوين مستعمرة/مل عند تغليف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* بحبيبات الالجيئات المحضرة بمواد صمغية مختلفة باستعمال تقنية البثق extrusion technique. وكذلك نشط Foerst et al.(2012) بكتريا *Lactobacillus paracasei* الى F19 الى تركيز لوغارتم 11 وحدة تكوين مستعمرة/مل لغرض تغليفها بجهاز vacuum-dried. كما استعمل Sharifi et al.(2021) تركيز خلية نهائي بلغ لوغارتم 9.30 وحدة تكوين مستعمرة/مل لتغليف بكتريا *Lactiplantibacillus plantarum* بمواد الصمغ العربي والفيتوسترول phyosterols عن طريق معقد التغليف المشترك coacervation complex.

4-4 محلول تغليف البكتريا العلاجية *L.reuteri*

يوضح الجدول (2-4) نتائج نسب المكونات المستعملة للحصول على افضل غلاف واستعماله في التغليف الدقيق لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* وحساب كفاءة عملية التغليف، اذا بينت النتائج ان افضل خليط لتغليف البكتريا كان متكون من 3.25 غم من الصمغ العربي مع 12 غم شرش حليب الجاموس المجفف وبإضافة 2.2 مل من المزرعة النشطة لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* ، اذ بلغ لوجاريتم اعداد البكتريا المغلفة 8.95 وحدة تكوين مستعمرة غم بينما كانت النسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف 76.23 % اذ تعمل بروتينات الشرش مع الصمغ العربي على تكوين روابط تحيط بالبكتريا وتحافظ عليها من الجفاف فضلا عن كونها ذات نفاذية وهذا يعطي للبكتريا امكانية الاستفادة من الوسط الغذائي ونموها واطلاق منتجاتها الايضية المفيدة للمضيف رغم محافظة الغلاف عليها من الظروف القاسية. وهذه النتائج تتفق مع (Phùng et al. (2021 الذي استعمل بروتينات شرش الحليب واللكتين في عملية تغليف بكتريا *L.reuteri* KUB-AC5 باستعمال التجفيف بتقنية spray drying بينما بين (Kajal et al. (2021 ان الصمغ العربي هو واحد من افضل الكربوهيدرات التي يمكن ان تستعمل في تغليف بكتريا *Lacticaseibacillus rhamnosus*. واستعمل (Sharifi et al. (2021 بروتينات شرش الحليب المعزولة والصمغ العربي في تغليف بكتريا *Lactiplantibacillus plantarum* بتقنية معقد التحفيز المشترك complex coacervation والتي أعطت اعلى كفاءة في تغليف البكتريا والمحافظة عليها.

الجدول (4-2) لوغاريتم اعداد بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* والنسبة المئوية لكفاءة

عملية التغليف باستعمال نسب مختلفة من مكونات خليط التغليف لاختيار افضل معاملة.

Run	Bacterial inoculum (ml)	Arabic gum	Whey (gm)	Bacteria number logarithm	Percent%
1	5.00	5.00	5.00	7.46	63.54
2	5.00	5.00	15.00	7.39	62.94
3	5.00	3.51	11.00	8.16	69.50
4	5.00	2.50	5.00	7.46	63.54
5	5.00	4.51	11.00	7.76	66.09
6	1.00	4.13	15.00	8.63	73.50
7	1.00	5.00	5.00	7.46	63.54
8	1.00	4.18	9.45	8.16	69.50
9	1.00	2.50	8.55	8.16	69.50
10	2.62	3.50	5.00	7.60	64.73
11	2.62	5.00	10.95	8.60	73.25
12	2.20	3.25	12.00	8.95	76.23
13	3.58	2.50	15.00	8.16	69.50
14	3.36	4.11	15.00	7.06	60.13
15	3.28	2.50	8.30	7.50	63.88
16	3.00	4.75	5.95	8.41	71.63

4-5 الظروف المثلى لاستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven في تغليف بكتريا

Limosilactobacillus reuteri

يوضح الشكل (4-3) الظروف المثلى لجهاز التجفيف تحت الضغط Vacuum oven. اذ بلغت اعلى عيوشية لبكتريا *L. reuteri* لوغارتم 11.04 وحدة تكوين مستعمرة/غم عند درجة حرارة بلغت $50 \pm 5^\circ\text{C}$ وضغط 50 ± 600 ملي بار. وبلغت افضل كمية انتاج للكبسولات المجففة 1.254 غم لكل 10 مل من محلول التغليف. و اختلفت هذه النتائج بسبب طول فترة التجفيف مع (Foerst et al., 2012) عند تغليف بكتريا *L. paracasei* F19 بجهاز Vacuum dried اذ استعمل درجة حرارة 15°C وضغط 15 ملي بار و لمدة 22 ساعة، وقد يعزى هذا الاختلاف لمواد وظروف التجفيف المختلفة. وكذلك اشار Chalal et al. (2009) الى انخفاض وقت التجفيف لبكتريا *L. helveticus* WS1032 الى 16 ساعة باستعمال Vacuum oven تحت ظروف تجفيف 100 ملي بار و 43°C .

جدول (3-4) الظروف المناسبة لتغليف بكتريا *L. reuteri* باستعمال جهاز التجفيف بالتفريغ

.Vacuum oven

لوغارتم اعداد البكتريا	الكمية الناتجة/غم	الوقت/ساعة	الضغط/ملي بار	درجة الحرارة	حجم العينة/مل
5.04	0.087	1	300	40	1
10.43	1.493	5	400	40	10
10.34	1.3561	5	400	50	10
10.74	1.1684	5	400	55	10
10.41	1.0023	5	400	60	10
10.20	0.9543	5	400	65	10
9.95	0.7126	5	400	70	10
9.30	0.5074	5	500	80	10
7.11	0.1517	1	500	40	1
10.64	1.335	3	600	40	10
10.51	1.270	3	600	50	10
11.04	1.254	3	600	55	10
10.61	1.018	3	600	60	10
10.32	0.9136	3	600	65	10
10.04	0.5568	3	600	70	10
9.85	0.354	3	600	80	10

6-4 صفات مسحوق البكتريا المغلفة

يبين الجدول (4-4) محتوى الرطوبة وكمية المسحوق والنسبة المئوية الانتاجية وفحص التلوث

الميكروبي للمسحوق الجاف للبكتريا المغلفة اذ لم يظهر اي نمو لمستعمرات بكتريا القولون Coliform

group وهذا يدل على عدم تلوث العينات المجففة بجهاز Vacuum oven بعد التجفيف، لكون

التجفيف اجري تحت ظروف معقمة. بينما بلغت كمية المسحوق الناتج 14 غم وكانت النسبة المئوية لإنتاجية

المسحوق بلغت 83.58% بعد التجفيف عند درجة حرارة 50 ± 5 م وضغط 600 ± 50 ملي بار ولمدة 180

دقيقة وكانت نسبة الرطوبة 4.26% وهي ضمن المدى المسموح به في المنتجات المجففة والتي لا تزيد عن

5% وان انخفاض الرطوبة في المسحوق الناتج يزيد من قوة التماسك بين بروتينات الشرش مع الصمغ العربي عبر روابط كلايكوسيدية وروابط ببتيدية وهذا بدوره يزيد من مقاومة المستعمرات البكتيرية المغلفة اتجاه درجات الحرارة والضغط، وتقاربت هذه النتائج مع ما توصل اليه (Sharifi et al. (2021) اذ وجد ان محتوى الرطوبة والنشاط المائي لكلا الكبسولات الدقيقة المنتجة بطرق التجفيف بالرش والتجميد أقل من 4.0%، عند تغليف بكتريا *L.plantarum* باستعمال الصمغ العربي و بروتينات الشرش. اشار *Gao et al.* (2021) الى أن مدة صلاحية المسحوق المحتوي على البكتريا المعزلات الحيوية *L.salivarius* UCC 118 و *L.paracasei* NFBC 338 تم تحسينها مع خفض محتوى الرطوبة بنسبة 4% أو أقل.

جدول (4-4) صفات الكيمائية والميكروبية للمسحوق الجاف للبكتريا *L.reuteri* المغلفة

النتيجة	الصفات
14.00±0.09	كمية المسحوق (غم)
83.58±3.82	النسبة المئوية الإنتاجية (%)
4.26±0.03	نسبة الرطوبة (%)
Nil	العدد الكلي لبكتريا القولون (وحدة تكوين مستعمرة/غم)

4-7 الأعداد الحية لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* المغلفة خلال مراحل الخزن

يبين الجدول (4-5) لوغاريتم اعداد البكتريا الحية والنسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف الدقيق خلال مدة الخزن عند درجة حرارة 4 م و 25 م لم يظهر تأثير معنوي ($P \leq 0.05$) في لوغاريتم الاعداد الحية للبكتريا المغلفة خلال فترة الخزن عند درجة حرارة 4 م و 25 م إذ بلغ 9.57 و 9.42 وحدة تكوين مستعمرة اغم على التوالي نهاية فترة الخزن بينما كانت النسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف الدقيق في الشهر الأول 99.19 % و 98.98% على التوالي وانخفضت هذه النسبة بتقدم فترة الخزن اذا بلغت في نهاية فترة الخزن (الشهر السادس) 96.86 % و 95.34 % لدرجتي الحرارة 4م و 25 م على التوالي. ان عملية التغليف الدقيق للبكتريا العلاجية ومنها *Limosilactobacillus reuteri* تساعد في المحافظة على الخلايا الحية للبكتريا

من المؤثرات الخارجية ومنها درجة الحرارة وتزيد من العمر الافتراضي وتبقى الخلايا الحية ضمن المستوى المطلوب.

جدول (4-5) لوغاريتم اعداد البكتريا الحية والنسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف الدقيق لبكتريا

Limosilactobacillus reuteri عند الخزن بدرجة حرارة 4م و 25 م لمدة 6 أشهر.

النسبة المئوية لكفاءة عملية التغليف الدقيق (%)		لوغاريتم اعداد البكتريا (وحدة تكوين مستعمرة اغم)		مدة الخزن (شهر)
25 م	4م	25 م	4 م	
98.98±3.13	99.19±2.55	9.78±0.30	9.80±0.23	1
98.17±2.30	98.78±2.87	9.70±0.15	9.76±0.11	2
97.77±2.18	98.17±2.48	9.66±0.09	9.70±0.21	3
96.55±1.78	97.67±1.99	9.54±0.13	9.65±0.16	4
96.15±1.95	97.36±2.09	9.50±0.19	9.62±0.19	5
95.34±1.90	96.86±1.87	9.42±0.25	9.57±0.09	6

ان التغليف بالسكريات مثل السوربيتول والتريهالوز ادى إلى تحسين بقاء *L.paracasei* أثناء التجفيف بالتفريغ vacuum oven. يعد الاستقرار عند درجة حرارة عالية ذا أهمية كبيرة حيث يساهم في زيادة انتاج الاغذية الوظيفية التي يتم تسويقها في درجة حرارة المحيط. اضافة لانخفاض تكاليف النقل والتخزين بشكل كبير. و يمكن تخزين الخلايا المجففة بالسوربيتول عند درجة حرارة 20 م دون انخفاض كبير في اعدادها. وبلغت اعداد البكتريا بعد التخزين 10^8 و 10^9 وحدة تكوين مستعمرة/غم عند نشاط مائي مقداره 22% و 7% على التوالي ولوحظ انخفاض أقل من دورة و دورتين لوغارتمية عند 37 م لمدة 3 أشهر، مقارنة مع انخفاض واضح لاعداد البكتريا عند محتوى نشاط مائي بلغ 33%. ويستفاد من أعداد الخلايا الاعلى من الجرعة الفعالة الموصى بها في منتجات المعززات الحيوية وعند درجات الحرارة المرتفعة عندما تكون الرطوبة النسبية منخفضة جداً لغرض تسويقها تجاريا عند التخزين والنقل. ويعزى ذلك لحقيقة أن معظم منتجات المعززات الحيوية في الاسواق تملئ

في عبوات تحميها بالفعل من الهواء و الرطوبة النسبية العالية Foerst et al. 2012; Frakolaki et al., (2021).

توصل Sharifi et al.,(2021) باستعمال طرق التجفيف بالرداذ والتجميد لتغليف بكتريا *L.plantarum* ATCC 8014 بمزيج بروتين الشرش المعزول و الصمغ العربي واخرى باضافة الفيتوسترول لانتاج كبسولات دقيقة صلبة، أن حيوية خلايا البكتيريا في الكبسولات المجففة قد تحسنت بوجود الفيتوستيرول وان معدل نمو الخلايا المجففة بالتجميد أفضل مقارنةً بالكبسولات المجففة بالرش خلال فترة 60 يوماً من الخزن، وقد انخفضت اعداد الخلايا المغلفة لبكتريا *L.plantarum* من 86.50% الى 70.01% في اليوم الأول والى 82.03 الى 59.51% في اليوم 60 من التخزين على درجة حرارة 25 م ، قد يكون الانخفاض بسبب درجات الحرارة العالية لجهاز التجفيف بالرداذ ونوع مادة التغليف او سلالة البكتريا مقارنة مع دراستنا الحالية.

8-4 تحليل المظهر الخارجي لغلاف البكتريا

يوضح الشكل (1-4) التحليل المظهر الخارجي للغلاف المحيط بالبكتريا العلاجية *L.reuteri* باستعمال المجهر الالكتروني (SEM) Scanning electron microscope، اذ بلغ قطر البكتريا 68.29 نانومتر بشكل قضيب شبه كروي. وكما يوضح الشكل فان البكتريا ملتصقة بجدار الغلاف المكون من الصمغ العربي وشرش الحليب بشبكة من الاواصر البروتينية والسكرية التي تحمي البكتريا من الظروف الخارجية وبوجود فراغ بسيط يسمح للبكتريا بإنتاج منتجاتها الايضية في الامعاء والوسط و اخذ ما تحتاجه من الغذاء لنموها وتكاثر مستعمراتها وعملها باليات مختلفة لحفظ توازن فلورا الامعاء الطبيعية. واتفقت هذه

النتائج مع Çelik and Turgay.(2021) اذ بلغت احجام الكبسولات لبكتريا *L.reuteri* DSM17938 من 68.81-351.0 ميكرومتر المغلفة بمواد الالجينات وfructooligosaccharide. وتختلف هذه الاقطار بسبب اختلاف مواد وتقنية التجفيف وهذا ما توصل اليه Mina et al.(2021) وWang and Mutukumira.(2022). و استعمل Vū et al.(2021) تقنية التجفيف بالرداذ في Spray-drying بكتريا *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 بمواد بروتينات شرش

الحليب المعزولة واللكتين وكانت غالبية كبسولات WPI الدقيقة كروية الشكل ومتعددة الحجم وذات سطحًا أملسًا.

يعزى التوزيع الواسع الحجم إلى حقيقة أن بروتينات شرش الحليب المعزولة (WPI) تحتوي على عدة بروتينات مميزة من المكونات مثل بيتا-لاكتوكلوبولين β -lactoglobulin (70.2%) والفا-لاكتوبومين α -lactalbumin (14.1%) وبروتين المصل serum albumin (8.2%) وبروتينات المناعة immunoglobulins (6.5%) واللاكتوفيرين lactoferrin (1.0%) (Tavares et al., 2014).

وفقًا للدراسات السابقة تتشكل الأسطح الكثيفة التي تحتوي على نسبة عالية من البروتين أثناء التجفيف بسبب هجرة البروتين النشط السطحي (Fyfe et al., 2011). وتظهر التجعدات لجسيمات المغلفات الدقيقة لبكتريا *L.reuteri* DPC16 المتكونة من حليب خالي الدسم المعاد تكوينه (RSM) والمجففة بالرش عند درجة حرارة دخول/خروج 80/160 م لأنها كانت مغطاة بالبروتين (Khem et al., 2016).

ذكر (Maciel et al., 2014) ان زيادة الخدوش/التجاويف على أسطح جسيمات غلاف بكتريا *L.reuteri* DPC16 وانخفاض الجزيئات الكروية مع زيادة درجة حرارة الخروج بوساطة التجفيف بالرش، وقد يُعزى تشابه الخدوش/التجاويف للمغلفات الدقيقة المتكونة من MWM و RSM إلى وجود بروتين شرش الحليب المعزول في تركيبه. اشار (Fazilah et al., 2019) الى أن شكل المساحيق المجففة تأثرت بإضافة الصمغ العربي لمواد تغليف البكتريا بالتجفيف.

ذكر (Rodrigues et al., 2022) ان شكل حبيبات بكتريا *L.reuteri* المغلفة بتقنية البثق extrusion technique، يظهر بصورة كروية نسبيًا و بشكل مستقل عند إضافة الصمغ لمحلول التغليف ولوحظ التوزيع المتجانس لـ *L.reuteri* في التشكل السطحي والمقطعي للجزيئات تحت المجهر الإلكتروني الماسح (SEM). وكانت الأشكال الكروية التي تحتوي على الصمغ تشير إلى أن أجزاء من هذه الغرويات المائية تبلورت على سطح الجزيئات، مما أدى إلى زيادة خشونة قليلاً.

وجد (Nasiri et al.,2021) وجود حبات كروية ذات سطح خشن عند تغليف *L.casei* في كبسولات دقيقة من الالجيئات مع صمغ بذور الميرمية البرية بوساطة تقنية المستحلب ويعزى ذلك لدمج صمغ بذور الميرمية البرية مع الالجيئات. كما وجد (Karimi et al.,2021) إن إضافة الالجيئات والصمغ يجعل سطح الحبيبات أكثر سلاسة ويحسن من حفظ الخلايا المغلفة لبكتريا *L.reuteri* القابلة للحياة.

ذكرت الدراسات السابقة أن مجموعة من مواد التغليف التي تحتوي على الصمغ العربي ساهمت في جعل سطح الجسيمات أكثر سلاسة مقارنة باستعمال الصمغ العربي وحده (Fazilah et al.,2019). قد يعزى زيادة حجم جزيئات مسحوق الغلاف لوجود الصمغ العربي مما زاد من لزوجة المادة. لذلك احتوت كبسولات الصمغ العربي على خدوش في سطحها. من المرجح أن تكون الخدوش ناجمة عن ارتفاع معدل تبخر الماء أثناء تجفيف الرذاذ مما يؤدي إلى انكماش الجزيئات (Kuck and Noreña,2016). إن استعمال أكثر من مكون أساسي في نظام التغليف أو التغليف المشترك يزيد من النشاط الحيوي للمكونات مقارنة بالتغليف بمادة واحدة (Sharifi et al.,2021).

استعمل جهاز SEM مع أنظمة EDS (كاشف مطيافية الأشعة السينية المشتتة للطاقة والتي يرمز لها EDS أو EDX وذلك من (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) للتشخيص المظهري والكيميائي. وهي تقنية تحليلية تستعمل من أجل تحليل العناصر لمعرفة الخصائص الكيميائية للعينات، وهي أحد أنواع مطيافية الأشعة السينية (نموذج ذري لتوضيح تكوّن الأشعة السينية المشتتة للطاقة)، ويعد هذا الأسلوب مفيداً في تحليل عينات قد تتعرض للتلف عندما يكون التحليل بالطرق التقليدية (Nasrazadani and Hassani.,2016). بين تحليل عينات البكتريا المغلفة بمواد الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس المجفف عن المحتوى المعدني للعينات مثل عناصر الكالسيوم والصوديوم والكلور والاكسجين و البوتاسيوم والكاربون كما موضح في الشكل (4-2). ويبين الجدول (4-6) ان اعلى نسبة مئوية بلغت 45.50% و 45.49% لذرات عنصر الكربون والاكسجين والكالسيوم على التوالي، وهذا يعطي انطباع

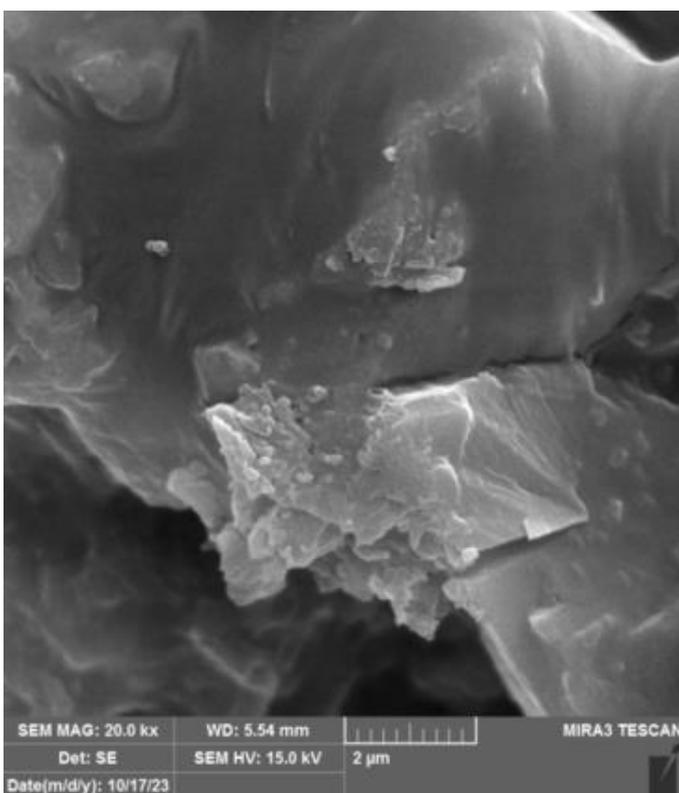
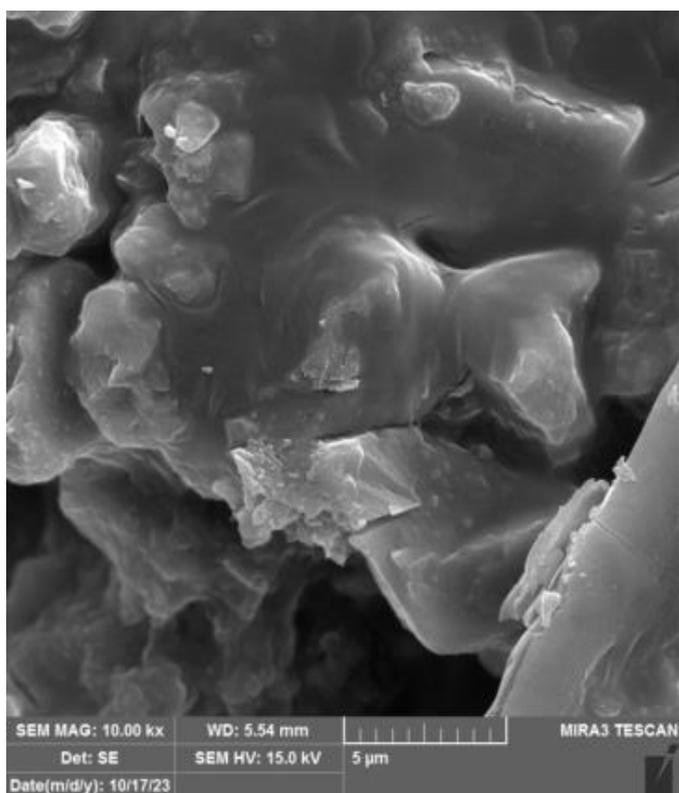
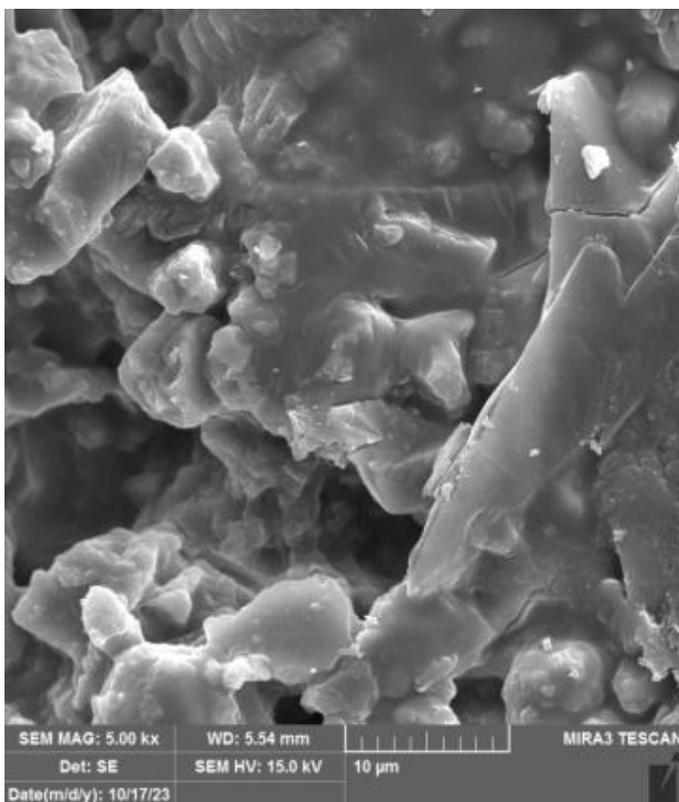
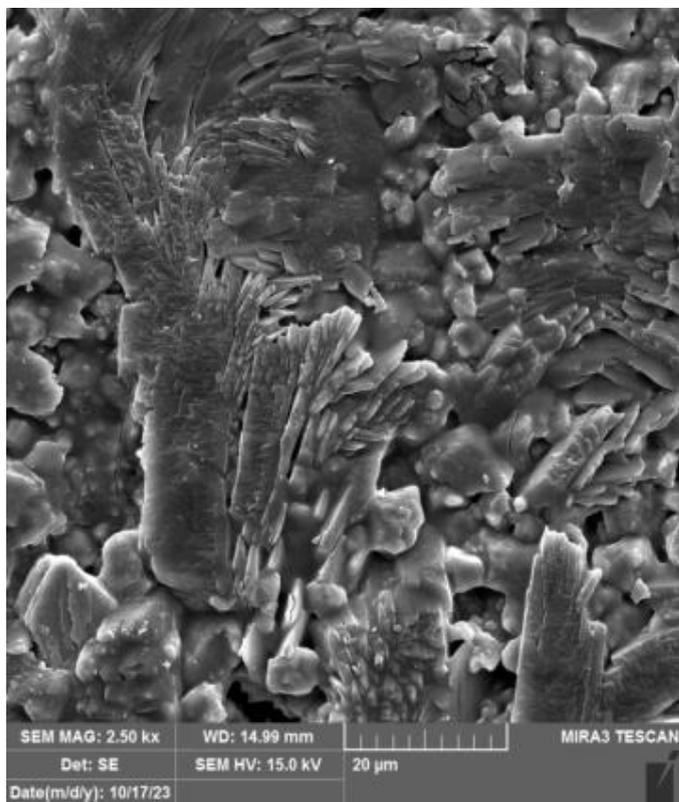
لوجود نسبة رطوبة مناسبة تستفاد منها خلايا البكتريا الحية فضلا عن وجود شبكة تماسك عالية بسبب التكافؤ العالي للكربون وجسور الكالسيوم القوية مما يعطي غلاف قوي ومناسب لحماية البكتريا من الظروف غير المناسبة. اما اقل تركيز كان لعنصر البوتاسيوم 0.53% والكلور 0.29% والصوديوم 0.14%. ولم يظهر عنصر النيتروجين اي نسبة رغم وجوده في الاحماض الامينية لبروتينات شرش حليب الجاموس الا انه قد يكون تحطم خلال مرحلة التجفيف بجهاز التجفيف بالرداذ Spray drying وجهاز التجفيف بالتفريغ Vacuum oven.

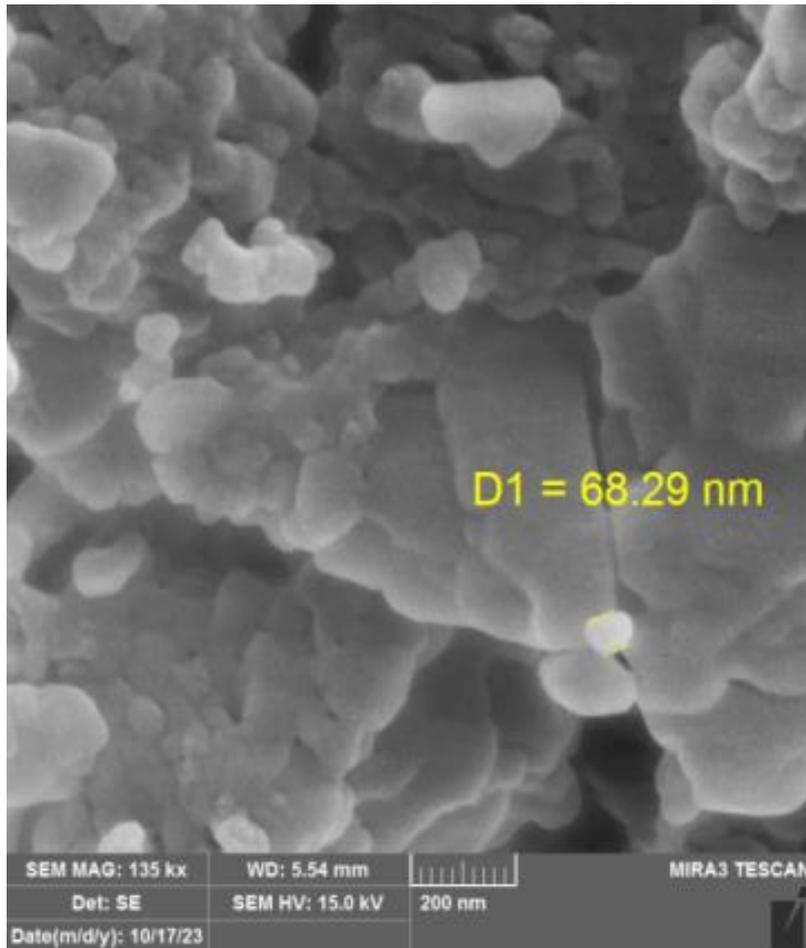
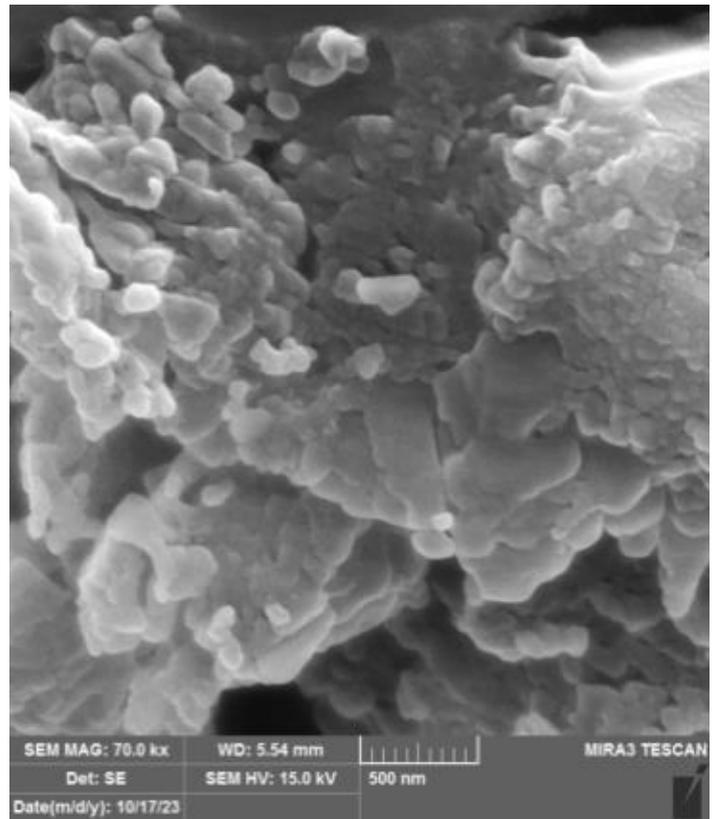
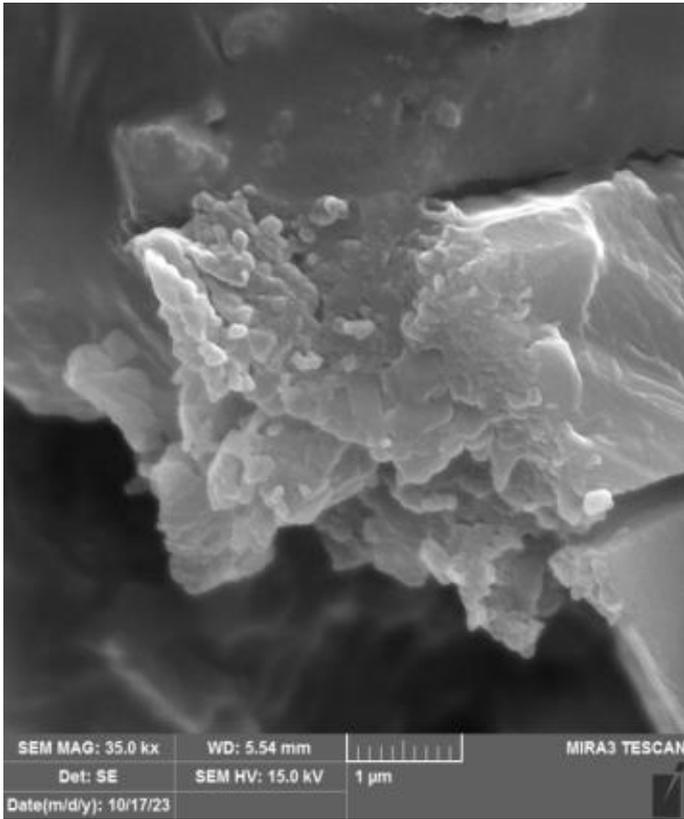
قد يعود سبب اختلاف النسب في العناصر المتواجدة في الغلاف المستعمل في تغليف البكتريا الى نوعية الشرش المستعمل والماخوذ من حليب الجاموس الذي يمتاز باحتوائه على العناصر الغذائية المهمة فضلا عن كون الصمغ العربي هو مادة طبيعية تحتوي على الكثير من العناصر المعدنية، فهو يحتوي على الكالسيوم بنسبة عالية فضلا عن تواجد البوتاسيوم والمغنسيوم (Zouari et al., 2020) تؤثر عمليات التجفيف على سطح المواد المغلفة وهذا بدوره يؤثر على طبيعة هذه المواد من حيث الالتصاق والترطيب والانتشار وهذا يعد امر حاسما في استعمال المواد المغلفة في العديد من التطبيقات الغذائية والصناعية الاخرى (Burgain et al., 2017).

وجد Mehra et al. (2022) عند تحليل عينة مجهرية بواسطة SEM لشرش لبأ الابقار BCWP. كان توزيع العناصر من حيث التوزيع الموحد والرسم النقطي للمعادن (Na، Ca، Cl، K، O، C، Se)، كما أظهر طيف EDS وجود البوتاسيوم و الكلوريدات و الكالسيوم و الصوديوم و المغنيسيوم، بالإضافة إلى العناصر التركيبية الكربون والأكسجين على سطح BCWP، وبحجم جسيمات تراوحت من 1-300 ميكرومتر عند قوة تكبير 500 نانومتر.

وجد Puttarat et al. (2021) ان أحجام بكتيريا *L.reuteri* TF-7 المغلفة بالتجفيف بالرش بمواد بروتينات الشرش المعزول والنشاء المقاوم بلغت حوالي 2-3 مايكرومتر في حين تراوحت أحجام جسيمات الكبسولة الدقيقة WPI و WPI-NCS ضمن نطاق 4-20 مايكرومتر. و أن أشكالها كانت عبارة عن أشكال كروية نسيبًا وأسطح جدران ناعمة بدون مسام وشقوق. تمتلك بروتينات شرش الحليب خصائص ذات

مميزات فيزيائية جيدة لهيكل الغلاف والتي يمكن أن تمنع تغلغل العوامل الضارة من البيئة الخارجية. على الرغم من تشابهها فقد لوحظ أن الكبسولات الدقيقة الكبيرة لبروتينات الشرش المعزول أكثر تقلصًا من ارتباطه بالنشاء البلوري المحور WPI-NCS الناتجة عن فقدان الرطوبة أثناء عملية التجفيف بالرداذ.





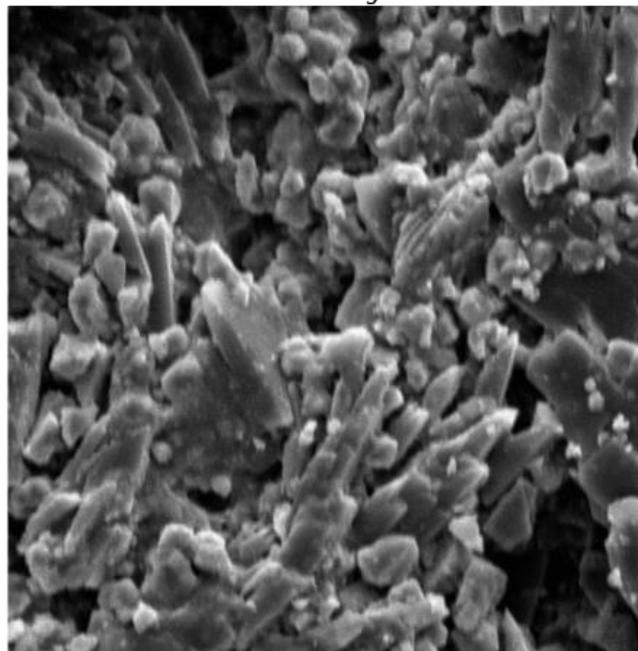
الشكل (1-4) تحليل المظهر الخارجي للكبسولات الدقيقة باستخدام المجهر الالكتروني (SEM) Scanning electron microscope

جدول (4-6) التحليل الكيميائي بنظام EDS لمكونات مزيج الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس

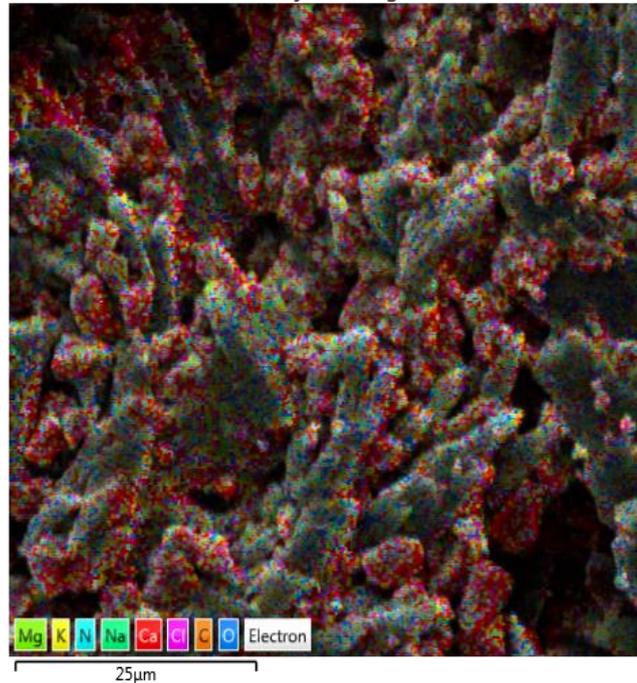
المجفف لغلاف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri*

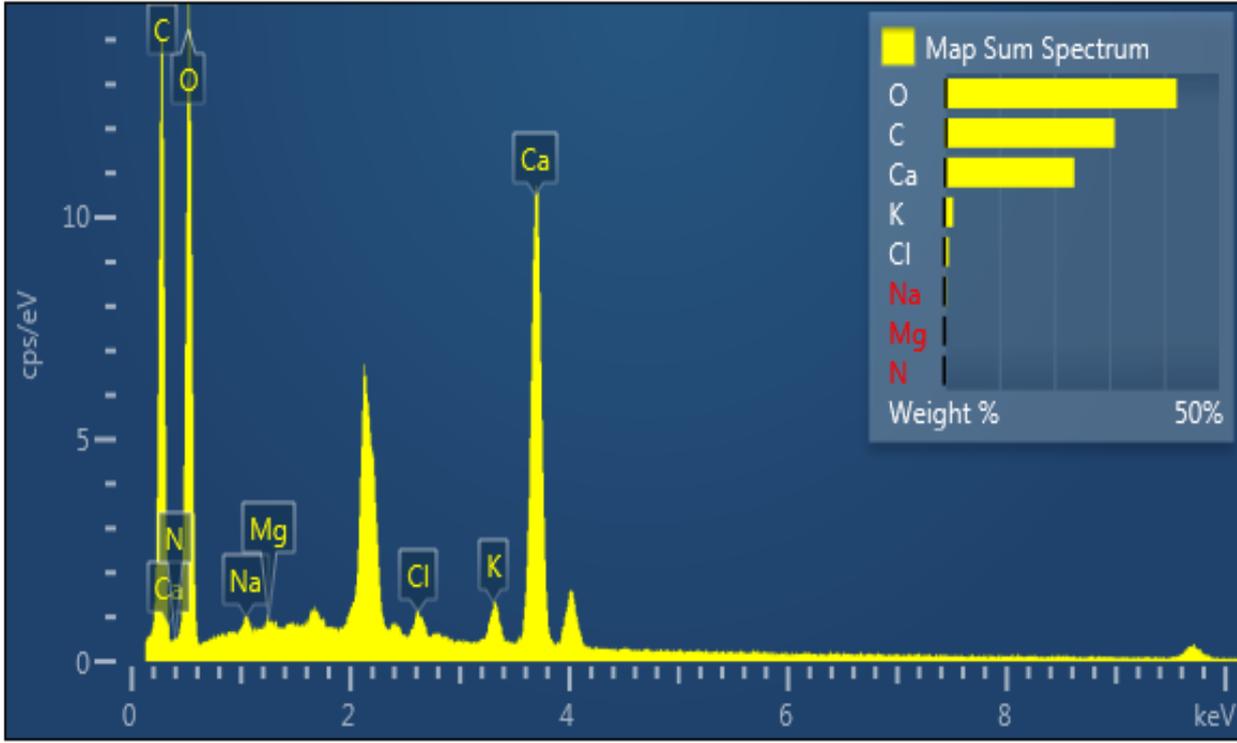
Element	Line Type	Apparent Concentration	k Ratio	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %	Standard Label	Factory Standard
C	K series	2.75	0.02748	33.51	0.31	45.50	C Vit	Yes
N	K series	0.00	0.00000	0.00	0.00	0.00	BN	Yes
O	K series	4.58	0.01540	44.63	0.30	45.49	SiO2	Yes
Na	K series	0.03	0.00013	0.20	0.06	0.14	Albite	Yes
Cl	K series	0.09	0.00076	0.64	0.05	0.29	NaCl	Yes
K	K series	0.19	0.00159	1.27	0.07	0.53	KBr	Yes
Ca	K series	2.66	0.02373	19.74	0.18	8.03	Wollastonite	Yes
Total:				100.00		100.00		

Electron Image 2



EDS Layered Image 2





الشكل (2-4) النسب المئوية لمكونات مزيج الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس المجفف لغلاف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* بنظام التحليل EDS.

9-4 التجربة المختبرية

1-9-4 دراسة اعداد بكتريا *L.reuteri* المغلفة خلال مراحل الجهاز الهضمي المختبري.

يبين الشكل (3-4) اعداد بكتريا *L.reuteri* المغلفة والحرّة خلال مرورها بمراحل الهضم في الجهاز الهضمي المختبري، اذ بلغت لوغارتم 10.053 وحدة تكوين مستعمرة/غم عند مقاومتها للهضم الميكانيكي والحموضة في المعدة والفم وبكفاءة تغليف بلغت 87.13%. وبلغت لوغارتم 9.95 وحدة تكوين مستعمرة/غم في اثني عشري الامعاء بكفاءة تغليف 86.315%، ولوغارتم 9.919 وحدة تكوين مستعمرة/غم في جزء اللفائفي للأمعاء الدقيقة بكفاءة تغليف 85.968%، في حين لم تقاوم البكتريا غير المغلفة ولم تصل بمستعمرات ذات عدد كافي في نهاية الهضم المعوي اذ بلغت لوغارتم 6.322 وحدة تكوين مستعمرة/غم لعينة السيطرة بكفاءة نمو منخفضة بلغت 54.82%. ونلاحظ من خلال النتائج ان الغلاف الذي احاط بالبكتريا

قاوم الظروف الميكانيكية والحامضية في الهضم المعدي والمعوي وحافظ على اعداد كافية من المستعمرات البكتيرية المغلفة.

وجد (Puttarat et al.(2021) أن خلايا *L.reuteri* TF-7 المغلفة ببيروتينات شرش الحليب و النشاء البلوري النانوي انخفضت بمقدار لوغارتم3.8 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد التعرض لساعتين في وسط المعدة عند اس هايدروجيني 2. في حين انخفض معدل بقاء الخلايا الحرة بمقدار لوغارتم 1.6 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد ساعة واحدة من التعرض لوسط الامعاء المختبري. و يعزى الانخفاض الحاد في قدرة الخلية غير المغلفة على البقاء إلى حقيقة أن الخلايا بعد إزالتها من سائل المعدة المختبري مصابة بجروح قاتلة وأكثر حساسية عند وصولها الى وسط الامعاء المختبري.

ووجد (Cabuk and Harsaa(2015) أن استعمال بروتين شرش الحليب والبولولان (pullulan) في تغليف بكتريا *L.acidophilus* NRRLB-4495 في مغلفات دقيقة أظهر كفاءة عالية لحمايتها من ظروف الجهاز الهضمي المختبري وبلغت معدل الاعداد الحية لوغارتم 8.03 وحدة تكوين مستعمرة/غم،مقارنة ببيروتينات شرش الحليب وحدها اذ بلغت لوغارتم 7.56 وحدة تكوين مستعمرة/غم. في حين بلغت نسبة الاعداد الحية للبكتريا الحرة(غير المغلفة) لوغارتم 6.67 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد الحضان في سائل المعدة المختبري. وكذلك اظهرت بكتريا *L.acidophilus* NRRLB-4495 المغلفة ببيروتين شرش الحليب مع مغلفات بولولان الدقيقة اعلى نسبة بقاء وكانت اعدادها لوغارتم 8.52 وحدة تكوين مستعمرة/غم مقارنة مع لوغارتم7.71 و لوغارتم7.10 وحدة تكوين مستعمرة/غم لبيروتينات شرش الحليب و الخلايا الحرة على التوالي، في سائل الامعاء المختبري.

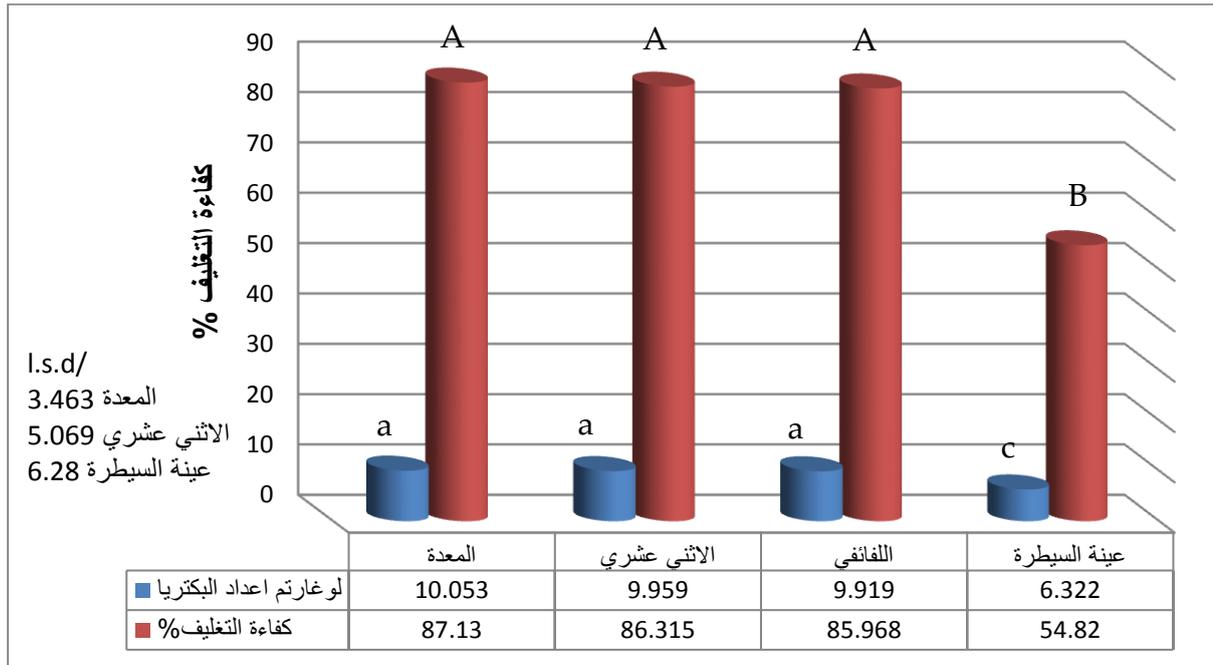
كذلك وجد(Phùng et al.(2021) انخفاض عدد خلايا بكتريا *L.reuteri* KUB-AC5 الحرة والمغلفة ببيروتينات الشرش المعزول واللكنين بجهاز التجفيف بالرداذ، بعد التعرض لمدة 120 دقيقة في سائل المعدة الحامضية من لوغارتم 9.2 وحدة تكوين مستعمرة/غم إلى لوغارتم 7.5 وحدة تكوين مستعمرة/غم و يعزى هذا

الانخفاض بسبب الظروف الحامضية للمعدة عند اس هايدروجيني 1.73، في حين بلغ نمو الخلايا المغلفة ببروتينات شرش الحليب لوغارتم 8.1 وحدة تكوين مستعمرة/غم.

قد تكون بروتينات شرش الحليب مسؤولاً عن تقليل التأثير السلبي للجهاز الهضمي في وسط المعدة المختبري على الخلايا (Rodrigues *et al.*,2011). اذ تقاوم بروتينات α - و β -lactoglobulin المختبري في شرش الحليب تحلل البيبسين بسبب بنيتها الكروية المدمجة (Halabi *et al.*,2020). و ذكر (Stojadinovic *et al.*(2013) بأن تركيب β -lactoglobulin ومتعدد الفينول يعزز استقرار البروتين لعملية الهضم بإنزيم البيبسين عند اعلى اس هايدروجيني لسوائل المعدة المحاكاة في المختبر.

يعزى قدرة المحاليل المنظمة لبروتينات الشرش إلى مقاومتها لحموضة المعدة، في حين أن البنية المعدلة للنشاء النانوي تقاوم نسبياً إنزيمات المعدة الهاضمة مما يساهم في تعزيز سلامة البنية الخارجية للكبسولات الدقيقة. علاوة على ذلك، فإن شبكة المتعددات الحيوية داخل بناء جدار الكبسولات الدقيقة قد تؤخر انتشار الإنزيمات الهضمية والاملاح الصفراوية أثناء العبور الى الامعاء (Ye *et al.*, 2019; Zou *et al.*,2012).

ذكر (Picot and Lacroix(2003 أنه بسبب الاختراق المحدود للحامض (أيونات H^+) والأوكسجين في نظام التغليف الذي يحتوي على مزيج فيه دهون، كانت بكتيريا المعززات الحيوية محمية أكثر في هذا النظام. الى جانب ذلك ذكر (Eratte *et al.*(2015) أن وجود زيت التونة في كبسولات دقيقة أدى إلى تحسين من بقاء بكتيريا *Lactobacillus casei* .



الشكل (3-4) كفاءة عملية التغليف لبكتريا *L.reuteri* المغلفة والحرّة خلال مراحل الهضم المختبري.

4-9-2 مقاومة املاح الصفراء

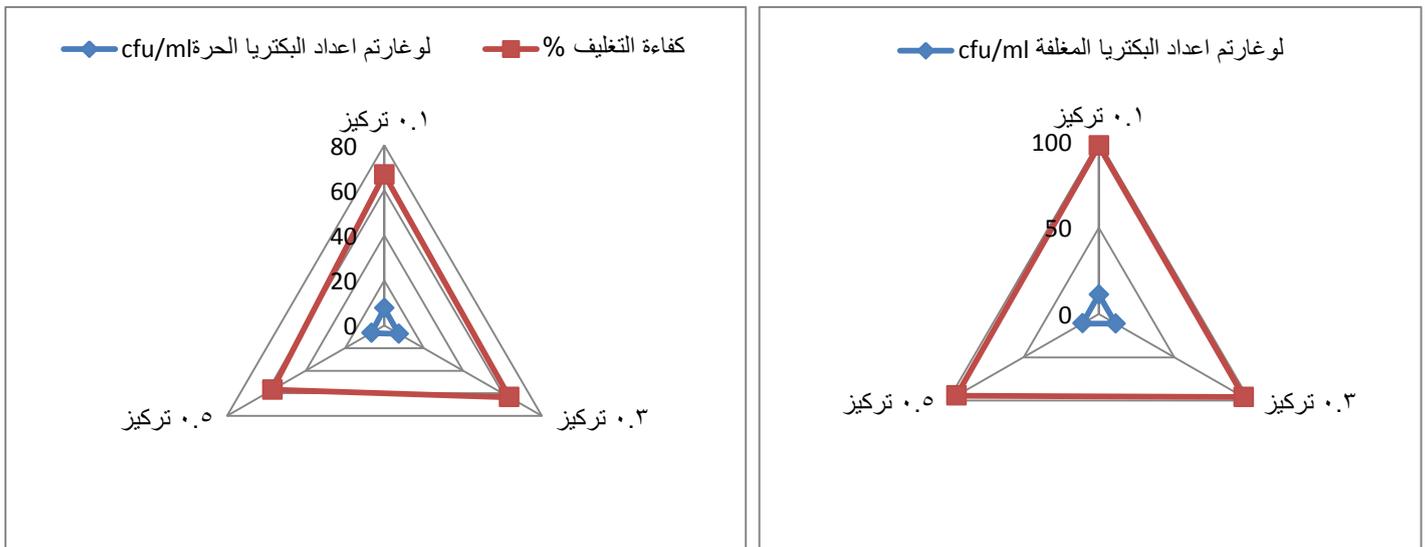
يمكن أن يكون لأملاح الصفراء الموجودة في الجهاز الهضمي تأثير مثبط على بكتريا المعززات الحيوية مما يقلل من عدادها. يبين الشكل (4-4) كفاءة بكتريا *L.reuteri* المغلفة والحرّة ضد املاح الصفراء اذ ارتفعت اعداد البكتريا المغلفة وبلغت لوغارتم 11.238 و11.082 و10.892 وحدة تكوين مستعمرة/مل بكفاءة تغليف (97.399 و 96.047 و 94.401%) في التركيز (0.1 و 0.3 و 0.5%) على التوالي. مقارنة مع البكتريا الحرّة (غير المغلفة) والتي بلغت لوغارتم 7.724 و7.322 و6.569 Cfu/g بكفاءة تغليف (66.95 و 63.45 و 56.93%) في التركيز (0.1 و 0.3 و 0.5%) على التوالي. ويعزى مقاومة البكتريا المغلفة لأملاح الصفراء لوجود الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس الذي يحتوي على بعض الكربوهيدرات والبروتينات وبعض الحوامض المهمة كالبرولين والسستين.

وجد Soltani Lak et al.(2021) أن الاملاح الصفراوية أدت إلى انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في

نسبة بقاء الخلايا الحية الحرّة والمغلف من بكتريا *L.reuteri*، اذ بلغت اعداد البكتريا الحرّة في 1% من املاح الصفراء لوغارتم 6.41 وحدة تكوين مستعمرة/مل، مقارنة مع البكتريا المغلفة التي بلغت لوغارتم 8.68 وحدة تكوين مستعمرة/مل. أظهرت هذه النتيجة الدور الوقائي لمواد التغليف (بروتين شرش الحليب المعزول

والانيولين وبروتين الصويا) ضد الأملاح الصفراوية. كان أعلى تأثير إيجابي لحماية البكتيريا المغلفة مرتباً ببروتين الشرش المعزول والانيولين حيث انخفض عدد البكتيريا بمقدار لوغارتم 0.24 وحدة تكوين مستعمرة/مل ، مقارنة مع لوغارتم 0.5 وحدة تكوين مستعمرة/مل للتغليف ببروتين الصويا المعزول فقط. وأشار Chen et al.(2017) إلى أن التغليف يمكن أن يمنع انخفاض عدد البكتيريا المعززات الحيوية في الجهاز الهضمي بوجود أملاح الصفراء. وأكد بعض الباحثين الذين درسوا بقاء بكتيريا حامض اللاكتيك في وجود أملاح الصفراء أنه يجب تحديد سلالات البكتيريا المعززات الحيوية التي تتحمل الصفراء والتي من المقرر استعمالها في الأغذية (Singhal et al., 2019 ; Allain et al., 2018). كما يعد اختيار نوعية مواد التغليف ضرورية للحفاظ على البكتيريا، حيث وجد Trindade and Grosso(2000) أن حبيبات ألجينات الكالسيوم لم تحمي *Bifidobacterium bifidum* و *L.acidophilus* من تراكيز مختلفة لأملاح الصفراء. كما أشار Guérin et al.(2003) لانخفاض أعلى في عدد البكتيريا المعززات الحيوية بعد تغليفه داخل مغلفات تتكون من البروتين وسكريات متعددة .

تؤدي خواص أملاح الصفراء المضادة للبكتيريا في وسط الأمعاء المختبري إلى تعطيل غشاء الخلية وتغيير تركيب البروتين واستقلاب الحديد والكالسيوم وأكسدة الحامض النووي وفي النهاية موت الخلايا (Begley et al.,2005).



الشكل (4-4) النمو البكتيري لبكتيريا *L.reuteri* بوجود تراكيز مختلفة لأملاح الصفراء .

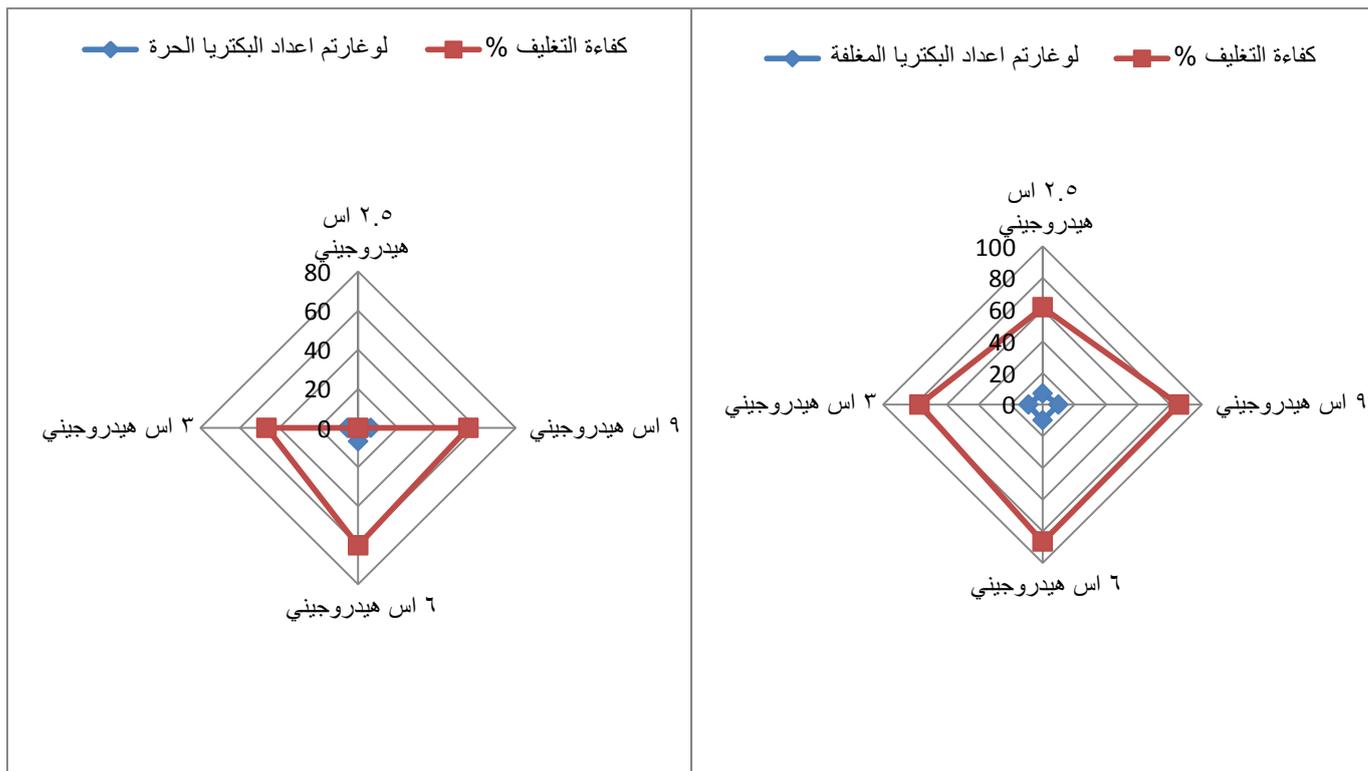
4-9-3 مقاومة الاس الهيدروجيني

تعتمد كفاءة بكتيريا المعززات الحيوية المفيدة للصحة في جسم الإنسان على قدرتها على البقاء في الجهاز الهضمي. يعد الاس الهيدروجيني للجهاز الهضمي كأحد العوامل المهمة التي تهدد بقاء البكتيريا المعززات الحيوية. يوضح الجدول (4-10) والشكل (4-5) مقاومة بكتيريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة ضد قيم مختلفة من الاس الهيدروجيني، اذ بلغت اعلى اعداد مستعمرات لوغارتم 8.908 وحدة تكوين مستعمرة/غم للبكتريا المغلفة بكفاءة تغليف 77.205%، مقارنة مع البكتريا غير المغلفة في عينة السيطرة التي بلغت لوغارتم 5.362 وحدة تكوين مستعمرة/غم بكفاءة تغليف 46.472% عند اس هيدروجيني 6. في حين بلغت اقل اعداد مستعمرات بكتيرية لوغارتم 7.079 وحدة تكوين مستعمرة/غم للبكتريا المغلفة بكفاءة تغليف 61.353%، بالمقارنة مع البكتريا غير المغلفة التي لم تنمو عند الاس الهيدروجيني 2.5. ويعزى افضلية مقاومة الظروف الحامضية للبكتريا المغلفة لاحتواء الغلاف على مواد كاربوهيدراتية وبروتينات تقاوم التغيير الحاصل في الاس الهيدروجيني. ونلاحظ وصول اعداد البكتريا المغلفة الى لوغارتم 8.908 و 9.857 عند كفاءة تغليف بلغت (77.205 و 85.43)% عند الاس الهيدروجيني 3 و 9 على التوالي. في حين بلغت لوغارتم 5.362 و 6.462 عند كفاءة تغليف (46.472 و 56.006)% عند الاس الهيدروجيني 3 و 9 على التوالي لعينة السيطرة التي تمثل البكتريا غير المغلفة.

وجد Soltani Lak *et al.*(2021) انخفاض بقاء اعداد البكتريا الحية عن طريق انخفاض قيمة الاس الهيدروجيني، اذ تمت ملاحظة الحد الاعلى لأعداد مستعمرات *L.reuteri* المغلفة عند اس هايدروجيني 7 لجميع العينات (لوغارتم 8.10 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين الصويا و لوغارتم 8.13 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين الصويا والانيولين و لوغارتم 8.14 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين شرش الحليب و لوغارتم 8.10 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين شرش الحليب والانيولين و لوغارتم 8.11 وحدة تكوين مستعمرة/مل للعينة الضابطة غير المغلفة). ولوحظ الحد الأدنى للنمو عند اس هيدروجيني 1.5 (لوغارتم 6.02 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين الصويا و لوغارتم 6.07 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين

الصويا والانيولين و لوغارتم 6.06 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين شرش الحليب و لوغارتم 6.14 وحدة تكوين مستعمرة/مل لبروتين شرش الحليب والانيولين و لوغارتم 4.10 وحدة تكوين مستعمرة/مل للعينة (الضابطة). كما تبين أن حيوية بكتيريا المعززات الحيوية في صورتها الحرة غير المغلفة كانت أقل معنوياً ($P \leq 0.05$) من تلك الموجودة في الصورة المغلفة عند قيم الأس الهيدروجيني 1.5 و 2.5، مما يدل على الدور الفعال لمواد التغليف في حماية *L.reuteri* ضد التغير في قيم الاس الهيدروجيني للجهاز الهضمي.

ذكر (Chandramouli et al., 2004) أن تغليف *Lactobacillus acidophilus* داخل حبيبات الالجيئات عزز قدرتها على البقاء عند اس هيدروجيني 2 إلى حد كبير. وكذلك (Afzaal et al., 2018) قدم التغليف كوسيلة لتعزيز بقاء البكتريا المعززات الحيوية في الحالة الحامضية للجهاز الهضمي. وفي أبحاث أخرى تمت الموافقة على أن تغليف الكائنات الحية الدقيقة بكتريا المعززات الحيوية هو وسيلة فعالة لزيادة قابليتها للحياة في المنتجات الحامضية المخمرة مثل الزبادي (Kia et Afzaal et al., 2019) ; *al.*, 2018. وانخفضت اعداد *L.acidophilus* NRRL-B 4495 الحرة (غير المغلفة) انخفاضاً كبيراً بمقدار 2.7 دورة لوغارتم، في حين أن الخلايا المغلفة ببروتينات شرش الحليب المعزولة كان انخفاضها بمقدار 0.81 دورة لوغارتم بعد حضانة 3 ساعات عند اس هيدروجيني 3 (Cabuk and Harsaa, 2015).



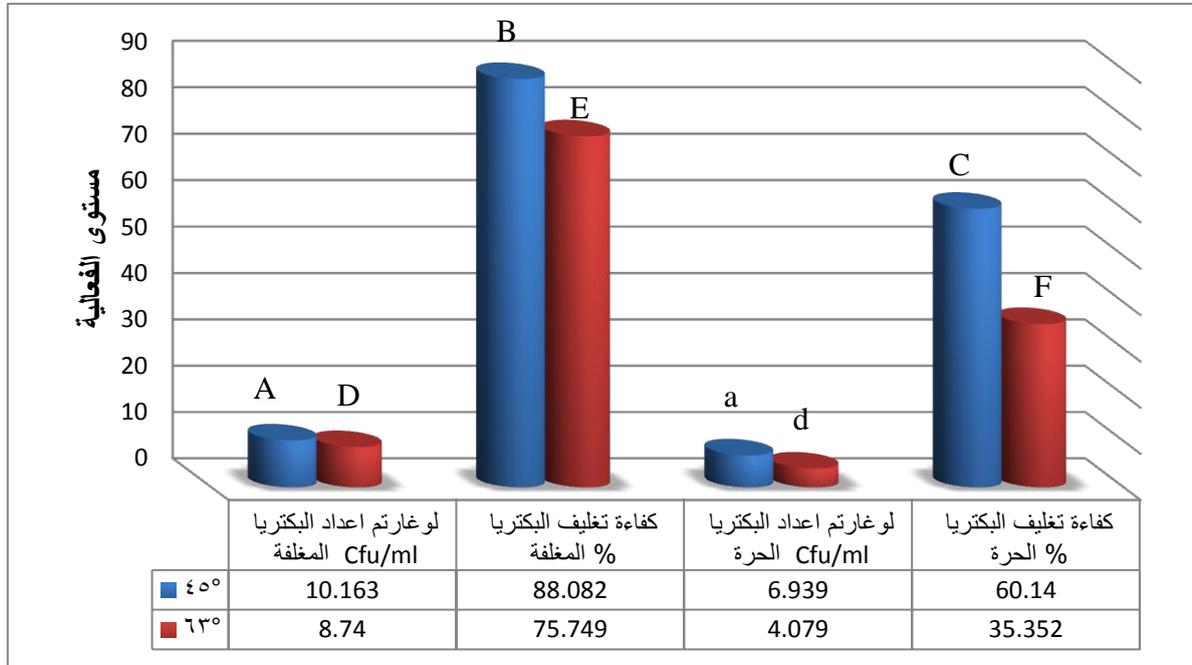
الشكل (4-5) تنمية بكتريا *L.reuteri* الحرة والمغلقة في قيم مختلفة من الـ اس الهيدروجيني.

4-9-4 مقاومة درجات الحرارة

يوضح الشكل (4-6) كفاءة مقاومة بكتريا *L.reuteri* المغلقة وغير المغلقة ضد درجات الحرارة، وكان افضل نمو للبكتريا المغلقة عند درجة حرارة 45 م والتي بلغت لوغارتم وحدة تكوين مستعمرة/غم 10.163 بكفاءة تغليف 88.082%، بالمقارنة مع البكتريا غير المغلقة التي بلغت لوغارتم 6.939 وحدة تكوين مستعمرة/غم بكفاءة تغليف بلغت 60.14%. وكانت ادنى اعداد مستعمرات بكتيرية عند درجة حرارة 63م والتي بلغت لوغارتم 8.74 وحدة تكوين مستعمرة/غم بكفاءة تغليف 75.749%، بالمقارنة مع البكتريا غير المغلقة التي بلغت لوغارتم 4.079 وحدة تكوين مستعمرة/غم بكفاءة تغليف 35.352%. ويعزى مقاومة البكتريا المغلقة لوجود الكربوهيدرات وبعض الحوامض والبروتينات المتربطة التي يتكون منها الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس والتي تكوّن شبكة محيطة بالبكتريا لحمايتها من درجات الحرارة المرتفعة.

وجد (Soltani Laket *al.*(2021) انخفاض اعداد مستعمرات بكتيريا *L.reuteri* غير المغلفة والمغلفة باستعمال أنواع مختلفة من مواد التغليف من لوغارتم وحدة تكوين مستعمرة/غم 8.08 في بداية التجربة إلى لوغارتم 8.04 وحدة تكوين مستعمرة/غم و لوغارتم 5.81 وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد المعاملة الحرارية عند 40م و60م على التوالي. ونظرًا للحساسية العالية للبكتريا غير المغلفة اتجاه درجات الحرارة فهي لا تستطيع البقاء عند 80م. الا ان التغليف ببروتينات الشرش والانيولين للبكتريا المعزلات الحيوية ادى إلى زيادة في اعدادها من لوغارتم 8.13 وحدة تكوين مستعمرة/مل إلى لوغارتم 8.18 وحدة تكوين مستعمرة/مل عند 40م، في حين عند درجة حرارة 60م و80م انخفض بشكل ملحوظ إلى لوغارتم 8.09 وحدة تكوين مستعمرة/مل و لوغارتم 7.31 وحدة تكوين مستعمرة/مل للبكتيا المغلفة على التوالي. بالنسبة للبكتريا المعزلات الحيوية المغلف داخل بروتين فول الصويا والشرش المعزول ، أدت المعاملة الحرارية (عند 60م و80م) إلى انخفاض في عدد البكتيريا (من لوغارتم 8.16 وحدة تكوين مستعمرة/مل و لوغارتم 8.14 وحدة تكوين مستعمرة/مل على التوالي). أدت درجات الحرارة المرتفعة إلى زيادة في انخفاض اعداد الخلايا الحية للبكتريا كما هو ملاحظ عند 80م (لوغارتم 7.24 وحدة تكوين مستعمرة/مل لعينة بروتين الصويا و لوغارتم 7.18 وحدة تكوين مستعمرة/مل لعينة بروتينات الشرش).

وجد (Kim *et al.*(2001) أن خلايا *L.acidophilus* كانت مقاومة لدرجة 53م، بينما توقف عن النمو عند 60م. في دراسة أخرى أجراها (Mandal *et al.*(2006) تبين أن التسخين عند 55م و60م و65م كان مثبتا للبكتيريا غير المغلفة مقارنة مع نمو البكتيريا المغلفة. وذكر (Cabuk and Harsa.(2015) أن التغليف الدقيق لبكتريا *L.acidophilus* NRRL B-4495 بمواد بروتين شرش الحليب مع بولولان كان أكثر كفاءة لبقاء اعدادها أثناء التخزين عند 4م لمدة 4 أسابيع (لوغارتم 0.21 ± 7.91 وحدة تكوين مستعمرة/غم) مقارنة مع مغلفات بروتين شرش الحليب (لوغارتم 0.31 ± 7.87 وحدة تكوين مستعمرة/غم) والخلايا الحرة (لوغارتم 0.21 ± 5.55 وحدة تكوين مستعمرة/غم).



الشكل (4-6) كفاءة بكتريا *L. reuteri* الحرة والمغلفة بعد التعرض للمعاملة الحرارية.

10-4 الصفات الفيزيائية والخصائص الكيميائية والمايكروبية والحسية لللبن المدعم بالبكتريا العلاجية

المغلفة *Limosilactobacillus reuteri*.

1-10-4 الخواص الكيميائية والفيزيائية للبن الرائب

يوضح الجدول (4-7) الاختبارات الكيميائية والفيزيائية للبن الرائب المصنوع من حليب الاغنام

والمدعم بإضافة بكتريا *L. reuteri* المغلفة بنسب مختلفة خلال فترة خزن استمرت الى 21 يوم عند درجة

حرارة 4م، اذ يلاحظ ارتفاعت قيمة الحموضة الكلية للبن الرائب المحتوي على البكتريا *L. reuteri* المغلفة في

نهاية فترة الخزن اذ بلغت (1.21 و 1.28) % مقدرة كنسبة حامض اللاكتيك في المعاملة T1 و T2 على

التوالي، بالمقارنة مع قيمة الحموضة الكلية في اليوم الاول من التصنيع والتي بلغت (0.94 و 0.98) % على

التوالي. الا ان قيمة الحموضة الكلية في عينة T0 بلغت (0.87 و 1.07) % في بداية التصنيع ونهاية فترة

الخزن على التوالي. ويعزى سبب الارتفاع في قيمة الحموضة كلما زاد وقت التخمر لاستهلاك البكتريا

للكربوهيدرات في الوسط مما ادى لارتفاع الحموضة في البكتريا المغلفة نسبة لارتفاع المواد الصلبة بالمقارنة

مع العينة التي تحتوي على بكتريا غير مغلفة والعينة التي تحتوي على بادئ اللبن الرائب فقط. ويؤيد ذلك ما

ذكره الدوسكي (2007) أن زيادة تركيز المواد الصلبة اللاذهنية أدت إلى زيادة الحموضة الكلية للحليب حيث بلغت (1.18 و 1.22 و 1.28) % عند تراكيز (12 و 15 و 18) % على التوالي.

وجد (Afzaal et al. (2019 ان تغليف بكتريا *L.acidophilus* ATTC-4356 بمادة ألجينات الصوديوم والكاراجينان خلال فترة التصنيع والتخزين اثرت على معايير مختلفة للبن الرائب عند مستوى معنوية ($p<0.05$) اذ ارتفعت قابلية نضوح الشرش والحموضة الكلية بينما انخفضت قيمة اللزوجة والاس الهيدروجيني خلال 28 يوماً من التخزين. ومع ذلك حافظ التغليف على تحسين صلاحية بقاء خلايا بكتريا المعززات الحيوية في اللبن الرائب المحضر وداخل الجهاز الهضمي. وذكر Terzioğlu and Bakırcı (2023) ارتفاع حموضة حليب الاغنام واللبن الرائب المصنع منه مقارنة مع حليب الابقار والجاموس، ويعزى ذلك الى محتواه العالي من الأملاح المعدنية والبروتين وثاني أكسيد الكربون المذاب.

بينما بلغت قيمة الاس الهيدروجيني (4.60 و 4.58 و 4.51) في المعاملة T0 و T1 و T2 على التوالي في اليوم الاول من تصنيع اللبن الرائب في حين بلغت (4.47 و 54.4 و 4.41) في المعاملة T0 و T1 و T2 على التوالي بعد 21 يوم من الخزن على درجة 4م. ويعزى سبب انخفاض الاس الهيدروجيني في المعاملة T1 و T2 لاستهلاك بكتريا البادئ والبكتريا المغلفة للكربوهيدرات الموجودة في حليب الاغنام وانتاج حامض اللاكتيك مما يسبب في ارتفاع الحموضة فيها مقارنة مع اللبن الرائب في عينة Tc، بينما عينة T0 التي بلغت قيمة اسها الهيدروجيني 4.61 في بداية التصنيع وانخفضت الى 4.46 في نهاية فترة الخزن عند 4م. وتقترب هذه النتائج مع ما توصل اليه (Al-Bedrani et al.(2023) اذ وجد ان قيم الاس الهيدروجيني pH في اللبن الرائب لحليب الابقار وحليب الجاموس وحليب الأغنام وحليب الماعز بلغت 4.61 و 4.68 و 4.51 و 4.20 على التوالي. قد تكون هذه الفروق في قيمة الحموضة بسبب المحتوى العالي من النيتروجين في حليب الاغنام اذ يلعب المحتوى العالي من البروتين فيها دوراً كبيراً في زيادة نشاط البادئ وبالتالي زيادة الحموضة. حيث يعمل وسط البروتينات كمحلول منظم يقاوم التغير في الحموضة خاصةً عند

بقاء بيئة النمو دون تغييرات كبيرة. ويمكن الإشارة الى أن الزيادة في عدد البكتيريا في البادئ ونشاطها يعتمد على محتوى البروتين في بيئة النمو وخاصة الأحماض الأمينية كون بعضها يحتوي على أكثر من مجموعة كربوكسيلية واحدة في تركيبها. يعود انخفاض قيم الاس الهيدروجيني لللبن الرائب المعدل وراثيًا إلى حقيقة أن نقطة التعادل الكهربائية للكازين المعدل وراثيًا تكون عند الاس الهيدروجيني 4.2 حيث يزداد ترابط بروتينات الكازين مع بعضها البعض وتبدأ بالتجمع والترسيب (Widyastuti and Febrisiantosa.,2014;).(Ranadheera *et al.*,2012).

ذكر (Revers *et al.*,2016) ان سبب انخفاض الاس الهيدروجيني في اللبن الرائب اثناء الخزن المبرد في درجة حرارة (0-5)م هو زيادة فعالية انزيم B-galactosidase مما يزيد في فصل الشرش الذي يؤثر على حيوية بكتريا حامض اللاكتيك من خلال زيادة ايونات الهيدروجين. كما وجد Afzaal *et al.* (2019) انخفاض في قيمة الاس الهيدروجيني من 4.88 إلى 4.43 خلال 28 يومًا من التخزين البارد للبن الرائب المصنع من البكتريا probiotic المغلفة. بينما بلغت نتائج قابلية ربط ماء 42.21 و 53.15% في المعاملة T1 و T2 على التوالي بعد 21 يوم من الخزن، ويعزى ذلك لارتفاع المواد الصلبة فيها بسبب اضافة البكتريا المغلفة بالصمغ العربي وشرش حليب الجاموس. في حين بلغت أدنى قابلية ربط ماء 33.17% في نهاية فترة الخزن في المعاملة T0. اما عينة اللبن الرائب الذي يحتوي على بكتريا *L.reuteri* غير مغلفة T0 بلغت قابلية ربط الماء 37.75% بعد 21 يوم من الخزن عند 4م. و تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Al-Bedrani *et al.*(2023) ان قابلية ربط الماء لمعاملات اللبن الرائب المصنع من حليب الأغنام والجاموس أعلى من اللبن الرائب المصنع من حليب الابقار والماعز. ويعزى ذلك لوجود نسبة عالية من المواد الصلبة الكلية في الحليب عززت صلابة الخثرة لأن محتوى البروتين في هلام اللبن الرائب يلعب دورا رئيسيا في قوة بناء شبكة البروتين. على عكس حليب الابقار والماعز يمتلك حليب الاغنام والجاموس مستويات أعلى من البروتين مما يزيد من قابلية ربط الماء WHC ويمنع تسربه من داخل روابط مصفوفة

البروتين. كما أن قابلية ربط الماء (WHC) الموجودة في اللبن المصنوع من الحليب قد يتأثر بمستوى الدهن فيه (Al-Bedrani *et al.*, 2019).

وتختلف قابلية ربط الماء من لبن رائب إلى آخر على عكس نضوح الشرش لذا فعند مقارنة أنواع اللبن الرائب التي تحتوي على كميات مماثلة من إجمالي المواد الصلبة الجافة ذات نسبة دهون عالية أشارت إلى تحسن في قابلية ربط الماء (WHC) بسبب ارتفاع نسبة المواد الصلبة الكلية فيها. وهذا يتوافق مع (Kim *et al.* (2020)، الذي ذكر أنه كلما ارتفعت قيمة قابلية ربط الماء قل نضوح الشرش في اللبن الرائب.

بلغت أعلى نسبة نضوح للشرش 83.27% في عينة Tc بعد 21 يوم من الخزن عند 4°م في حين كانت أدنى قابلية نضوح للشرش في البكتريا المغلفة والتي بلغت 68.3% و61.85% في عينات T1 و T2 على التوالي وهذا يدعم نتائجنا السابقة في قابلية ارتباط الماء بسبب ارتفاع المواد الصلبة. وهذه النتائج تختلف عن (Al-Bedrani *et al.*, 2023) الذي أشار إلى أن قابلية نضوح الشرش للبن الرائب المصنوع من حليب الأغنام بلغ 71% بالمقارنة مع باقي أنواع اللبن الرائب المصنوع من حليب الإبقار والجاموس والماعز، وهذا الاختلاف قد يكون بسبب إضافة البكتريا المغلفة للبن الرائب هنا مما رفع من قوة تكوين الهلام وتماسك روابط وجسور البروتين وقل ذلك من نضوح الشرش.

يعد الاختلاف في التركيب الكيميائي لأنواع مصادر الحليب مسؤولاً عن نسبة التباين الكبير في قيم نضوح الشرش لأنواع اللبن الرائب وخاصة نسبة البروتين المسؤولة عن زيادة الارتباط المتبادل في شبكة البروتين، فعندما ترتفع مستويات بروتين الحليب يزداد الارتباط المتبادل في شبكة البروتين والترابط المائي مما يقلل من فصل شرش الحليب وهو ما يتوافق مع ما وجدته (Vital *et al.*, 2015) وهذا يدعم نتائجنا بسبب ارتفاع نسبة البروتين في البكتريا المغلفة المضافة للبن الرائب. لذلك وجد (Al-Bedrani *et al.*, 2023) أن كمية شرش الحليب المنفصل كانت أقل لكل عينة من عينات اللبن الرائب (الأغنام، الجاموس) مقارنة بعينات اللبن الرائب (الماعز، الإبقار) بسبب محتواها العالي من المواد الصلبة الكلية لكل من حليب الأغنام والجاموس (Ibrahim

Gilbert et al.,) and Doosh.,2017). وبعد تقليل انفصال شرش الحليب ميزة جيدة ومهمة للبن الرائب (Gilbert et al.,) (2020).

جدول (4-7) الخواص الكيميائية والفيزيائية لللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة وخلال فترات الخزن المختلفة.

الاختبارات	عينات اللبن الرائب	فترة الخزن (يوم)				L.S.D
		1	7	14	21	
الحموضة التسحيحية%	Tc	0.84	0.93	0.98	1.11	0.0895
	T0	0.87	0.94	0.96	1.07	
	T1	0.94	0.97	1.15	1.21	
	T2	0.98	1.13	1.19	1.28	
الاس الهيدروجيني	Tc	04.6	4.59	4.53	4.47	0.04630
	T0	4.61	4.55	4.50	4.46	
	T1	4.58	4.52	4.48	4.45	
	T2	4.51	4.48	4.44	4.41	
قابلية ربط الماء%	Tc	43.31	42.85	38.95	33.17	2.382
	T0	45.45	43.23	40.16	37.75	
	T1	47.90	44.45	45.70	42.21	
	T2	58.40	57.2	56.75	55.15	
نضوح الشرش%	Tc	71.45	73.06	75.50	83.27	2.440
	T0	68.21	70.50	72.39	75.55	
	T1	63.65	65.11	66.76	68.30	
	T2	60.35	61.15	62.18	63.50	

2-10-4 الاختبارات الميكروبية لللبن الرائب

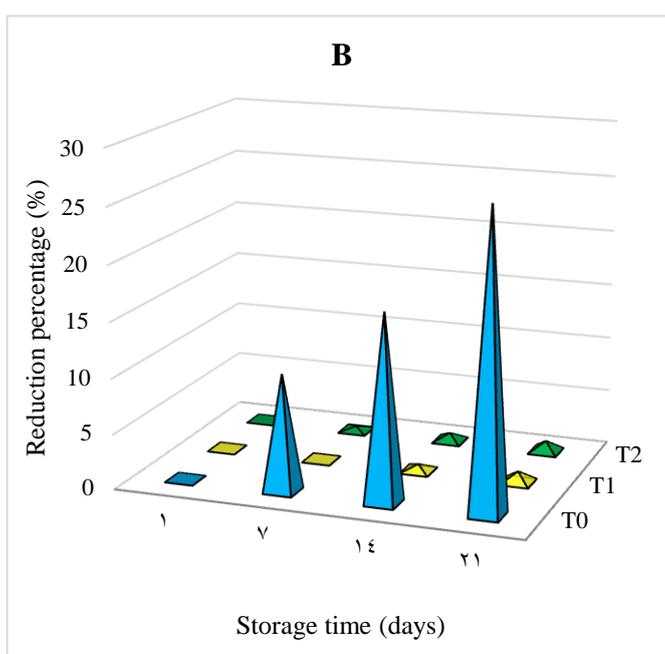
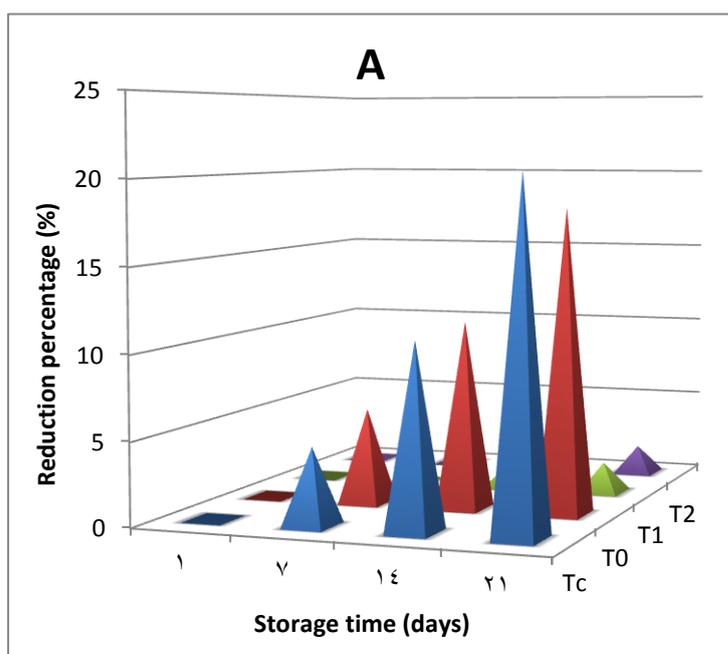
يوضح الجدول (4-8) لوغاريتم اعداد الحية لبكتريا حامض اللاكتيك واعداد بكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة وبكتريا القولون و اعداد بكتريا *Staphylococci* في عينات اللبن الرائب المصنع من حليب الاغنام وخلال فترة الخزن المبرد. في اليوم الأول من الخزن بلغ لوغاريتم اعداد بكتريا حامض اللاكتيك 8.44، 9.55، 9.08، 9.13 وحدة تكوين مستعمرة اغم لعينات Tc، T0، T1، T2 على التوالي، بينما كان لوغاريتم اعداد بكتريا *L.reuteri* بلغت 8.22، 8.00، 8.13 وحدة تكوين مستعمرة اغم لعينات T0، T1، T2 على التوالي. بينما لم تظهر أي نمو لبكتريا القولون والأنواع التابعة لبكتريا *Staphylococci* ولاحظ انخفاض في اعداد بكتريا حامض اللاكتيك واعداد بكتريا *L.reuteri* غير المغلفة خلال فترات الخزن المبرد وأزداد الانخفاض

مع زيادة مدة الخزن بينما حدث انخفاض بسيط في الاعداد الحية لبكتريا *L. reuteri* المغلفة في العينات T1 و T2 فبلغ لوغاريتم اعدادها في اليوم الأخير للخزن 7.92 و 8.05 وحدة تكوين مستعمرة اغم على التوالي، في حين كان لوغاريتم الاعداد الحية لبكتريا *L.reuteri* في عينة اللبن الرائب الحاوية على البكتريا غير المغلفة T0 6.02 وحدة تكوين مستعمرة اغم و لم تظهر أي نمو لبكتريا القولون والأنواع التابعة لبكتريا Staphylococci في نهاية فترة الخزن. ان درجة الحرارة المنخفضة وارتفاع نسبة الحموضة خلال فترة الخزن كان لها تأثير سلبي في اعداد الخلايا الحية لبكتريا البادئات المستعمل في انتاج اللبن الرائب ويلاحظ ان العينات T1 و T2 حافظت على اعداد البكتريا بفضل التغليف الدقيق لهذه البكتريا الذي استطاع الحفاظ عليها بالمقدار المطلوب توفره بالأغذية حسب ما اوصت به منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية (WHO,2006)، وذكر (Wang and Zhong, 2024). ان المستوى الموصى به من الاحياء المجهرية probiotic في الاغذية الحاملة يتراوح من $10^6 - 10^7$ وحدة تكوين مستعمرة اغم او مل) لغرض الحصول على فوائد صحية للمضيف.

جدول (8-4) لوغاريتم اعداد البكتريا في عينات اللبن الرائب المضاف اليه البكتريا المغلفة وخلال فترات الخزن المختلفة.

الاختبارات	عينات اللبن الرائب	فترة الخزن (يوم)				L. S. D
		1	7	14	21	
Total lactic acid bacteria	Tc	8.44	8.05	7.51	6.68	0.4704
	T0	9.55	9.00	8.47	7.81	
	T1	9.08	9.02	8.95	8.92	
	T2	9.13	9.08	9.00	8.96	
<i>L. reuteri</i>	Tc	-	-	-	-	0.611
	T0	8.22	7.35	6.83	6.02	
	T1	8.00	8.00	7.95	7.92	
	T2	8.13	8.10	8.07	8.05	
Total coliform bacteria	Tc	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T0	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T1	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T2	Nil	Nil	Nil	Nil	
Staphylococci	Tc	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T0	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T1	Nil	Nil	Nil	Nil	
	T2	Nil	Nil	Nil	Nil	

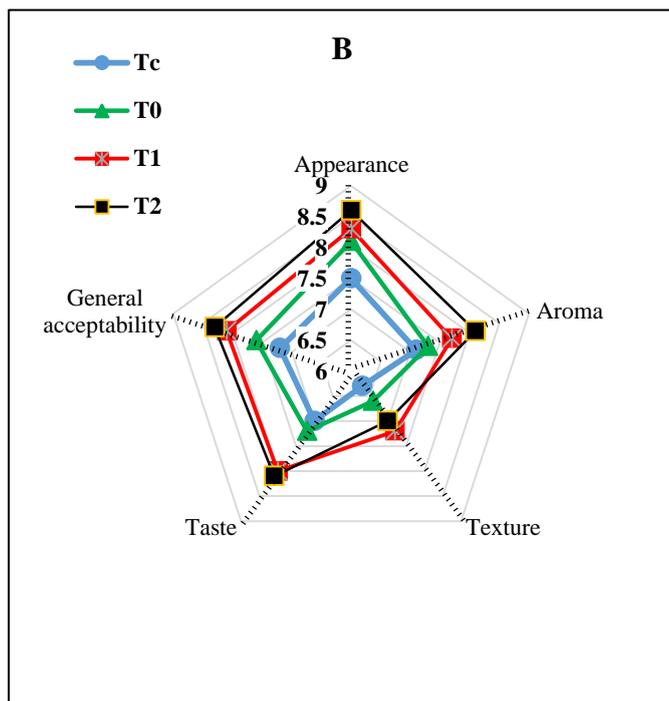
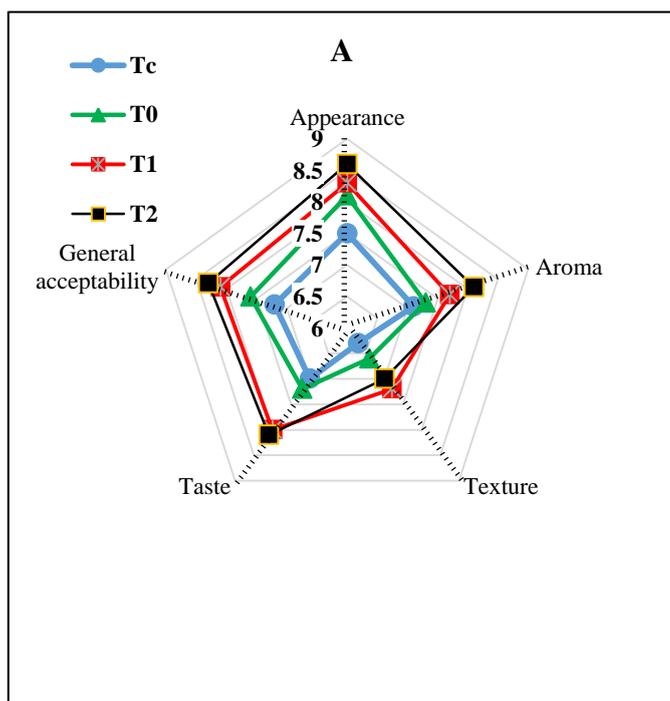
كما يبين الشكل (4-7) النسبة المئوية للخفض الاعداد الحية لبكتريا حامض اللاكتيك وبكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة في عينات اللبن الرائب وخلال فترة الخزن المبرد اذ يلاحظ حدوث انخفاض كبير في اعداد بكتريا حامض اللاكتيك في العينة Tc و T0 اذ بلغت في نهاية فترة الخزن 20.58 % و 18.21% على التوالي بينما كانت 1.86 و 1.72 لعينات T1 و T2 على التوالي. اما نسبة الخفض لبكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة في عينات اللبن الرائب بعد 21 يوم من الخزن المبرد كانت 26.76 % و 1.00% و 0.98% لعينات T0 و T1 و T2 وعلى التوالي. ان التغليف الدقيق لبكتريا تعمل على حمايتها من الظروف الخارجية مثل الحموضة المرتفعة ودرجات الحرارة المنخفضة مما يزيد من عيوشية البكتريا ويحافظ على اعدادها الحية. هذه النتائج جاءت منقفة مع العديد من الدراسات السابقة التي بينت أهمية عملية التغليف الدقيق للبكتريا والاحياء العلاجية Probiotics في المحافظة على اعداد البكتريا ضمن المستوى المطلوب في المنتجات الغذائية مثل منتجات الالبان Niamah *et al.*, 2021; Niamah *et al.*, 2018). بينما ذكر Jones *et al.* (2012) ان بكتريا *L. reuteri* المغلفة والمستعملة في انتاج اللبن الرائب مع البادئ القياسي ادت الى خفض نسبة الكوليسترول الضار وكمية الكلسيريادات الثلاثية.



الشكل (4-7) نسبة الخفض في الاعداد الحية للبكتريا المتواجد في عينات اللبن الرائب خلال مدة الخزن المبرد، (A) بكتريا حامض اللاكتيك، (B) بكتريا *L.reuteri*

3-10-4 الاختبارات الحسية لللبن الرائب

يبين الشكل (4-8) نتائج التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب المضاف اليها البكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة في اليوم الأول و الأخير من الحزن المبرد وظهرت النتائج ان التقييم الحسي في اليوم الأول من الحزن حدوث تفوق بسيط في عينات اللبن الرائب المضاف اليها البكتريا المغلفة بتركيز 1% و 3% وقد يعود السبب الى ان إضافة بكتريا *L.reuteri* مع بكتريا البادئ قد أدى الى انتاج مركبات ايضية ومنها مركبات النكهة نتيجة تحلل الدهون في الحليب مما يعطي اكثر تقبلا من قبل المستهلكين (Niamah *et al.*, 2023; Verma *et al.*, 2022). كما ان إضافة البكتريا المغلفة الى عينات اللبن الرائب يزيد من نسبة المواد الصلبة الكلية وهذا يحسن من القوام والمظهر الخارجي. وان المواد المستعملة في التغليف (بروتينات الشرش والصمغ العربي) تساعد على ربط الماء وتقلل من نضوح الشرش. وبعد 21 يوم من الحزن، لم يلاحظ أي اختلاف كبير في صفات المظهر والرائحة والطعم والتقبل العام بين أنواع عينات اللبن الرائب. هذه النتائج اتفقت مع Çelem (2023) اذ بين ان استعمال بكتريا *Lactobacillus acidophilus* المغلفة في انتاج اللبن الرائب لم تؤثر على الصفات الحسية للمنتج النهائي بعد 35 يوم من الحزن المبرد. بينما وجد Li *et al.*(2021) ان استعمال البكتريا *Lacticaseibacillus paracasei* المغلفة أدى الزيادة قابلية ربط الماء وتحسين الخواص الريولوجية واطهر الفحص تحت المجهر الالكتروني تقليل المسامات في القوام بينما لم تظهر هذه الصفات عند استعمال البكتريا الحرة (غير المغلفة).



الشكل (4-8) التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب المضاف اليه بكتريا *L. reuteri* المغلفة وغير المغلفة، (A) في اليوم الأول من الخزن، (B) بعد 21 يوم من الخزن المبرد

11-4 التجربة الحيوانية

1-11-4 الاختبارات المايكروبية :

1-1-11-4 تقدير العدد الكلي لبكتريا *Limosilactobacillus reuteri* في براز حيوانات التجارب :

يوضح الجدول (4-9) ارتفاع اعداد مستعمرات بكتريا *L.reuteri* المغلفة في براز الجرذان نهاية التجربة، اذ استطاع غلاف البكتريا المكون من الصمغ العربي وشرش حليب الجاموس المجفف من مقاومة ظروف الجهاز الهضمي كحموضة المعدة واملاح الصفراء والحفاظ على البكتريا بأعداد كافية مقارنة مع عينة السيطرة والجرذان التي جرعت بالبكتريا الحرة (غير المغلفة). اذ بلغ اعلى عدد مستعمرات لوغارتم 9.204 و 10.342 cfu/g في العينات T1 و T3 على التوالي بالمقارنة مع لوغارتم 5.602 و 3.886 وحدة تكوين مستعمرة/غم في العينات Tf و Tc على التوالي، بعد 60 يوم من التجربة. وتتفق هذه النتائج مع *Vũ et al.* (2021) الذي وجد ان تغليف بكتريا *L.reuteri* KUB- AC5 بمواد اللكتين وبروتينات شرش الحليب المعزولة يوفر لها حماية افضل ضد ظروف التخزين والجهاز الهضمي. بينما وجد (Schell and Beermann, 2014) ان تغليف بكتريا *L.reuteri* DSM 20016 بمسحوق شرش الحليب وصمغ

shellac بتقنية الطبقة المميعة وتقنية الطلاء بالرش العلوي، يحسن من فعالية تطبيقات الأغذية الحاوية على المعززات الحيوية، وتمكنها من تعزيز مقاومة الظروف الحامضية وزيادة بقاء البكتيريا تحت ظروف الجهاز الهضمي أثناء العبور من خلال المعدة والأمعاء.

توصل Jantzen et al., (2013) الى ان تغليف بكتريا *L.reuteri* في الخليط المحتوي على 10^9 وحدة تكوين مستعمرة/غم باستعمال شرش الحليب المعزز بالخميرة واستعمال تقنية التجفيف بالرداذ، يجعل المغلفات الدقيقة الناتجة مستقرة أثناء التخزين ويعطي اعداد بكتيريا كافية عند عبورها لظروف المعدة واستقرارها في الامعاء.

اشار Ali et al. (2021) أن تغليف *L.reuteri* باستعمال مستحلبات مزدوجة يحميها من الظروف القاسية أثناء التخزين والهضم المعدي والمعوي. اذ انخفض استقرار التغليف (من لوغارتم 6.25 إلى لوغارتم 2.69 وحدة تكوين مستعمرة/مل) أثناء الهضم في المختبر مقارنة بالعينات المغلفة (من لوغارتم 6.69 إلى لوغارتم 4.64 وحدة تكوين مستعمرة/مل).

وجد Schell and Beermann. (2014) ان فعالية الخلايا المغلفة لبكتريا *L.reuteri* DPC16 بمواد حليب الفرز والالجينات وخصائصها الوظيفية ضد بعض مسببات الأمراض كان اعلى بكثير مقارنة مع الخلايا الحرة (غير المغلفة) عند مرورها عبر ظروف الجهاز الهضمي مما يسمح بإطلاق الخلايا في سائل القولون وبالتالي القيام بدورها الفعال وقدرتها على التنافس للالتصاق بالخلايا الظهارية وتنشيط التصاق *E.coli*.

جدول (4-9) لوغارتم اعداد بكتريا *Limosil.reuteri* المغلفة في براز حيوانات التجارب (وحدة تكوين مستعمرة/غم).

يوم	Tc	T3	T1	Tf
20	5.778	10.342	9.204	8.113
40	5.301	10.041	9.176	6.845
60	3.886	9.431	8.903	5.602

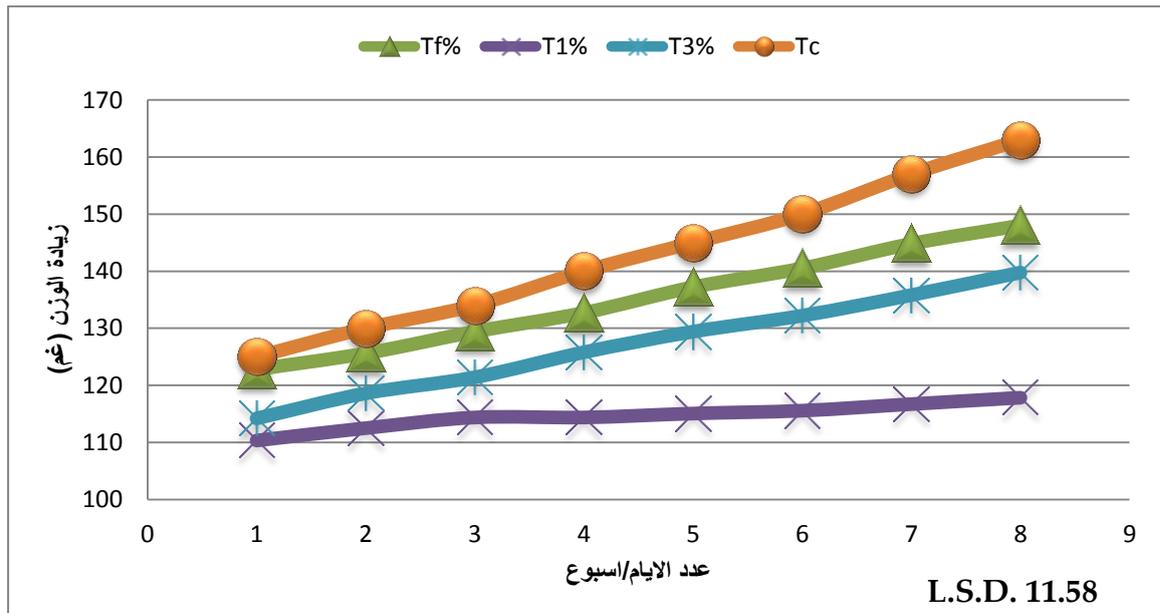
- (Tf): مجموعة الجرذان التي تناولت العليقة القياسية مع التجريع باللبن الرائب المضاف اليه بكتريا غير مغلفة (حرة).
(T1): مجموعة الجرذان التي تناولت العليقة القياسية مع التجريع باللبن الرائب المضاف اليه بكتريا مغلفة بتركيز 1%.
(T3): مجموعة الجرذان التي تناولت العليقة القياسية مع التجريع باللبن الرائب المضاف اليه بكتريا مغلفة بتركيز 3%.
(Tc): مجموعة الجرذان التي تناولت العليقة القياسية فقط.

11-4 - 2 الخصائص المدروسة :

1-2-11-4 سمات النمو

1-1-2-11-4 متوسط وزن الجسم (غم).

يوضح الشكل (4-9) متوسط اوزان جرذان المختبر خلال فترة التجربة، اذ نلاحظ حصول زيادة في التركيز Tf والتي تحتوي على البكتريا *L.reuteri* غير المغلفة بنسبة 25.2% في بداية التجربة ونهايتها على التوالي، في حين ان جرذان المختبر التي جرعت لبن رائب في المعاملة (T1 و T3) بلغت نسبة الزيادة في نموها 7.5 و 25.56% في نهاية التجربة على التوالي. اما في جرذان عينة السيطرة (Tc) والتي كانت تتناول العليقة بدون لبن رائب ولا بكتريا مغلفة فقد بلغت نسبة زيادة وزنها 38% في نهاية التجربة. وهذه النتائج تتفق مع Bibi et al.(2023) اذ وجد ان تتناول بكتريا *L.plantarun* MZ707748، *L.plantarun* MZ729681 و *L.acidophilus* 14 قللت من اوزان ذكور جرذان المختبر مقارنة مع مجموعة السيطرة. بينما اشار Wang et al.(2012) وصول وزن جرذان المختبر الى 139.8 غم بعد اربع اسابيع من تناولها طعام بمقدار 445.2 غم يحتوي على بكتريا حامض اللاكتيك. و اشار Gryaznova et al.(2024) الى ان متوسط استهلاك العلف اليومي للجرذان بلغ 5.1 غرام/يوم.



الشكل (4-9) متوسط اوزان الجسم للحيوانات المختبرية خلال فترة تجريب 60 يوم.

11-4-2-1-2 زيادة الوزن الأسبوعية (غم):

بلغ متوسط الزيادة في وزن جردان المختبر خلال الاسبوع الثاني من التجريب (125.60 و112.5 و123.60)غم، وبلغ في الاسبوع الاخير من التجربة (148 و117.83 و139.76)غم في المجاميع (Tf وT1 وT3) على التوالي، في حين بلغت Tc 130 و163غم في الاسبوع الثاني والاخير من التجربة. نلاحظ حصول زيادة نسبية بلغت (0.4 و-1.02 و1.6)غم/100غم من العليقة في المجاميع (Tf وT1 وT3) على التوالي في حين بلغت الزيادة الاسبوعية في Tc 38%.

وجد Hradicka et al.(2023) زيادة في وزن الجسم اذ بلغت 400.5غم في مجموعة الجردان التي تتناول مزيج من سلالات *lactobacilli* مقارنة مع 404.6غم في مجموعة السيطرة بعد 8 اشهر من التجربة وكانت كمية الطعام المتناولة 23.1غم/يوم في مجموعة بكتريا *lactobacilli* مقارنة مع 24غم/يوم في مجموعة عينة السيطرة. على الرغم من انخفاض تناول الطعام في مجموعة probiotics بشكل ملحوظ مقارنة بمجموعة حيوانات عينة السيطرة، إلا أن قيمة نسبة كفاءة تحويل الغذاء زادت بشكل ملحوظ اذ بلغت 13.33% للمعاملة T1 و2.63% في Tc، مما يشير إلى زيادة القدرة على تحويل الطعام إلى كتلة الجسم الناجمة عن تناول بكتريا *lactobacilli* وهذا يعني زيادة نشاط الحركة للمعاملات التي جرعت بالبكتريا المغلفة.

11-4-2-3-1-2 وزن الكبد والكليتين (غم):

يوضح الجدول (4-10) وجود زيادة طفيفة في اوزان الكبد والكليتين، اذ بلغ متوسط وزن الكليتين والكبد 1.74 و7.126غم في المعاملة T1، في حين بلغ 1.677 و7.022غم في المعاملة T3 مقارنة مع 1.727 و6.941غم في Tc على التوالي. وهذا يعني ان تناول الغذاء الوظيفي المحتوي على بكتريا مغلفة وحرّة (غير مغلفة) لا يؤثر على الناحية الفسيولوجية للأعضاء في جسم حيوانات المختبر.

اشار Bibi et al.,(2023) الى حصول زيادة طفيفة في وزن الكبد بسبب الاثار الصحية لبكتريا

المعززات الحيوية مقارنة مع عينة السيطرة الايجابية التي بلغت 5.70غم في حين بلغ وزن الكبد في

مجموعة الجرذان (6.37±0.9 و 8.97±0.3 و 5.57±0.5) غم في المجموعة التي تغذت على سلالات بكتريا المعززات الحيوية التجارية *L.acidophilus-14* والبكتريا المعزولة في المختبر *L.plantarum* (MZ707748) و *L.plantarum* (MZ729681) على التوالي.

وجد (Aminlari et al. (2019) ان وزن الكبد بلغ في عينة السيطرة 8.98 بعد 28 يوم من التجربة الحيوانية التي تناولت عليقة غنية بالكولسترول في حين بلغ 11.01 و 10.11 في الجرذان التي تغذت على عليقة تحتوي على *L.plantarum* و *B.coagulans* على التوالي. وبعد 50 يوم من التجربة بلغ وزن الكبد 11.81 في عينة السيطرة، في حين بلغ 13.35 و 12.72 غم في عينة بكتريا المعززات الحيوية. وجد ان وزن الكليتين بلغ في عينة السيطرة 1.83 بعد 28 يوم في عليقة غنية بالكولسترول في حين بلغ 2.01 و 2.01 غم في الجرذان التي تغذت على عليقة تحتوي على *L.plantarum* و *B.coagulans* على التوالي.

جدول (4-10) اوزان الاعضاء الداخلية (الكليتين والكبد/غم) لحيوانات التجارب نهاية التجربة .

المعاملات	الكبد	الكليتين
Tf	6.883	1.683
T1	7.126	1.74
T3	7.022	1.677
Tc	6.941	1.727
L.S.D	4.08	0.724

4-11-2-2 الصفات الفسيولوجية:

4-11-2-2-1 العدد الكلي لخلايا الدم الحمراء والبيضاء والهيموكلوبين (RBC, WBC and HGB) يبين الشكل (4-10) تفوق مجموعة الجرذان التي تغذت على العليقة القياسية والتجريب باللبن الرائب المضاف اليه بكتريا *L.reuteri* المغلفة بتركيز 3% عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) في كل من كريات الدم البيض والحمراء ونسبة الدم، وبلغ اعلى تركيز لها (11.7 و 7.56 و 13.6) على التوالي، مقارنة مع (7.8 و 5.93

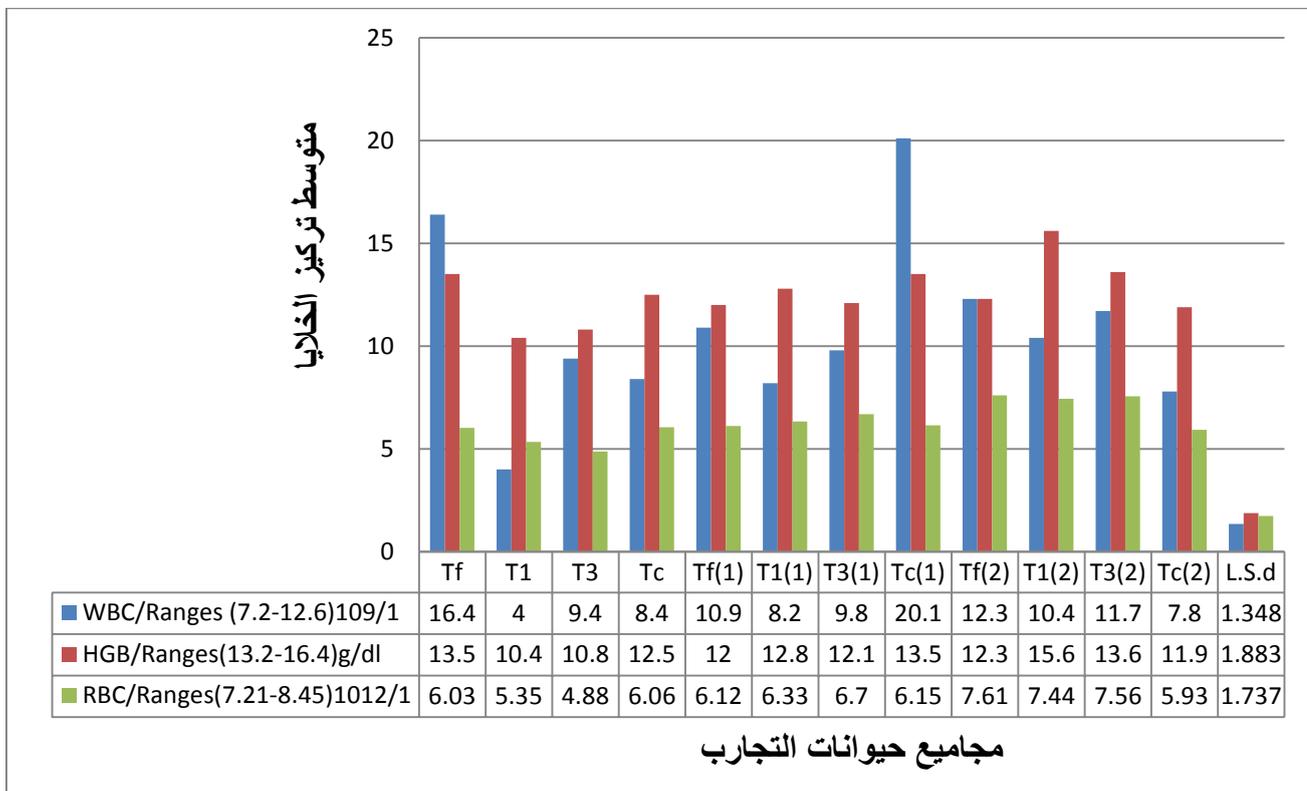
و11.9) في مجموعة الجرذان عينة السيطرة. وهذا يعني ان بكتريا المعززات الحيوية تمكنت من تحسين فلورا الامعاء في حيوانات المختبر، كما ان الغلاف استطاع مقاومة ظروف الجهاز الهضمي والحفاظ على اكير عدد من مستعمرات البكتريا لإضفاء تأثيراتها الصحية على صفات الدم لجرذان المختبر مقارنة مع مجموعة الجرذان التي جرعت لبن رائب يحتوي على بكتريا غير مغلفة . كما تحسنت التغذية لدى المجاميع التي جرعت بكتريا المعززات الحيوية نهاية التجربة حيث بلغ اعلى تركيز PLT (829 و1163) $1/10^9$ في مجموعة T1 وT3% على التوالي، مقارنة مع (797 و133) في مجموعة Tf وTc على التوالي. كما بلغ اعلى تركيز لـ MPV (6 و5.8) F1 في مجموعة T3 وTc على التوالي.

تتفق هذه النتائج مع Sakai *et al.* (2021) الذي وجد أن خلايا الدم البيضاء (WBCs) مثل الخلايا القاعدية والوحيدات والخلايا الحمضية والعدلات الليمفاوية تنظم الجهاز المناعي وتحمي الجسم من المواد المسببة للحساسية والالتهابات والأمراض. واستعمل Paineau *et al.*, (2008) $(10^{10} \times 1)$ وحدة تكوين مستعمرة/مل او غم من سلالات *Bifidobacterium lactis* و *L.acidophilus* ووجد أن هذه السلالات قللت بشكل كبير من مستويات IgG في مصل الدم.

تناقص عدد خلايا الدم البيضاء الكلي مع تقدم عمر الجرذان ولم يتأثر ببكتريا المعززات الحيوية، ولوحظ انخفاض كبير في عدد الخلايا في نهاية التجربة في مجموعة عينة السيطرة اذ بلغت عدد كريات الدم البيض 9.87 ± 0.43 و 9.98 ± 0.47 ($10^9/l$) بعد شهر واحد من التجربة، و 7.47 ± 0.39 و 7.07 ± 0.32 ($10^9/l$) بعد خمسة اشهر، و 7.03 ± 0.61 و 4.06 ± 0.25 ($10^9/l$) بعد 8 اشهر لكل من مجموعة بكتريا المعززات الحيوية وعينة السيطرة على التوالي، الا أن تناول المعززات الحيوية على المدى البعيد حفز الجهاز المناعي (Hradicka *et al.*, 2023).

ذكر de Carla *et al.* (2020) عند تجريع جرذان Wistar rats البيضاء بمكملات فموية تحتوي على بكتريا *L.plantarum*، زاد تركيز Hb و PCV و RBC. بينما بين Korčok *et al.* (2018) ان هذه الزيادة تعود إلى تنشيط الأعضاء المكونة للدم وبعض بكتيريا حمض اللاكتيك، مثل *Lactobacilli*، والتي تزيد بشكل غير مباشر من توافر الحديد الغذائي من خلال سلسلة من العمليات، والتي تشمل تقليل درجة الحموضة المعوية. وجد Obazelu *et al.* (2021) أن المعززات الحيوية تحسن الظروف الصحية عن طريق رفع

مستويات الهيموكلوبين وحجم الخلايا المعبأة وعدد خلايا الدم الحمراء دون التسبب في تغييرات ضارة في معايير الدم. وذكر (de Carla et al., 2020) أن البروبيوتك يمكن أن يحسن المشاكل الصحية عن طريق زيادة تركيز الهيموكلوبين وعدد خلايا الدم الحمراء.



الشكل (4-10) تأثير بكتريا *L.reuteri* المغلفة والحرّة على مصّل دم حيوانات التجارب : Tf و T1 و T3 و Tc: حيوانات التجارب التي تناولت العليقة القياسية قبل تجريب اللبن الرائب. Tf(1) و T1(1) و T3(1) و Tc(1): مجموعة حيوانات التجارب بعد 20 يوم من تجريب اللبن الرائب. Tf(2) و T1(2) و T3(2) و Tc(2): مجموعة حيوانات التجارب نهاية التجربة (60 يوم من التجريب).

2-2-2-11-4 الاختبارات البايوكيميائية Biochemical tests

1- 2-2-2-11-4 تركيز الكلوكوز:

ارتفع متوسط تركيز سكر الكلوكوز في دم حيوانات التجارب التي تتغذى على العليقة الطبيعية فقط اذ بلغ gm/dl(0.46185) ، في حين بلغ متوسط تركيز الكلوكوز gm/dl (0.428605) في الجرذان التي جرعت بالمعززات الحيوية غير المغلفة، اما في الجرذان التي جرعت بالبكتريا المغلفة فقد انخفض تركيز الكلوكوز فيها مقارنة مع عينة السيطرة والبكتريا غير المغلفة، اذ بلغ متوسط تركيز الكلوكوز فيها (0.286) gm/dl(0.228995) في المجاميع T1 و T3% على التوالي. وتدعم هذه النتائج الاثار المفيدة لبكتريا

L.reuteri بسبب تخمرها للكلوكوز وتحوليه الى نواتج مفيدة للمضيف كالحوامض قصيرة السلسلة وغيرها، وحماية الغلاف لهذه البكتريا من عمليات الهضم خفض اكثر من نسبة السكر في الدم لوصول نسبة اعداد اعلى من بكتريا *L.reuteri* في المضيف.

بينت معظم الدراسات السابقة تأثير المعززات الحيوية والمحفزات الحيوية على التحكم في سكر الدم أو تقليل الأنسولين في الدم. حيث وجد (Vakilpour et al., 2024) انخفاض تركيز الأنسولين بعد تناول الفركتوز oligofructose بشكل كبيراً بعد 4 أسابيع لدى مرضى الكبد الدهني غير الكحولي. في دراسة أخرى، تبين أن تأثير مكملات المعززات الحيوية على تحسين معايير السكر في الدم أدى إلى انخفاض كبير في مستويات الكلوكوز والأنسولين أثناء الصيام مقارنة بمجموعة الدواء الوهمي (Iatcu et al., 2021).

كما وجد أن المعززات الحيوية فعالة في تحسين مقاومة الأنسولين عن طريق تقليل تركيز السموم الداخلية وزيادة درجة حموضة البراز وكذلك عن طريق تقليل إنتاج وامتصاص السموم المعوية (Eslamparast et al., 2014) وبالتالي يمكن أن تكون الاحياء المجهرية في الأمعاء فعالة في تحسين حالة السكر في الدم من خلال استعمال المعززات الحيوية والمحفزات.

درس تأثير إضافة بكتريا *L.plantarum* و *B.coagulans* إلى النظام الغذائي على نسبة الكلوكوز في الدم (ملغ/ديسيلتر) لدى ذكور الجرذان المصابة بفرط الكوليسترول والتي أعطيت محلول كلوكوز (5 غم/كغم من وزن الجسم). حيث انخفض تركيز سكر الدم الى 115.0 و 121.5 (mg/dl) بعد 28 يوم من التجربة. في حين ارتفع الى 147.7 و 165.3 (mg/dl) بعد 50 يوم من التجربة مقارنة مع 127.0 (mg/dl) في مجموعة عينة السيطرة (Aminlari et al., 2019).

11-4-2-2-2-2 تركيز الدهون الكلي :

يوضح الشكل (11-4) تأثير بكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة على دهون الجسم في مصل دم حيوانات التجارب. اذ تفوقت البكتريا المغلفة عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) في خفض الكوليسترول الكلي و البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL والبروتين الدهني منخفض الكثافة جدا VLDL و الدهون الثلاثية Triglycerides(Tg) ورفع مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة HDL في مصل دم الجرذان المختبرية طوال فترة التجربة، بالمقارنة مع مجموعة الجرذان في Tc والعينة التي جرعت ببكتريا غير مغلفة. وبلغ اعلى تركيز 51.755 و 55.66 Mg/dl للكوليسترول الكلي و 11.17 و 9.485 Mg/dl لا LDL و 38.175 و 39.775 Mg/dl لا HDL و 8.255 و 5.345 Mg/dl لا VLDL و 41.29 و 26.725 و 61.41 و 66.575 Mg/dl لا Trig. في T1 و T3 على التوالي. في حين بلغ اعلى تركيز 66.575 و 61.41 Mg/dl للكوليسترول الكلي و 15.175 و 13.375 Mg/dl لا LDL و 25.425 و 27.53 Mg/dl لا HDL و 9.96 و 13.625 Mg/dl لا VLDL و 68.14 و 50.37 Mg/dl لا Trig. في Tc و Tf على التوالي. وهذا التباين في التركيز يعطي الاهمية القصوى لتغليف البكتريا العلاجية لحمايتها من الظروف المحيطة وبالتالي الحفاظ على نسبة الدهون المفيدة في الجسم وهي احد الاليات المقترحة في السيطرة على مرض السمنة. وهذه النتائج تتفق مع (Idan et al., 2024) الذي وجد انخفاض معايير الدهون Tg و LDL و VLDL بسبب إعطاء مشروب شرش الحليب بنكهة العنب والمدعم بالمعزز الحيوي *L.acidophilus* في النظام الغذائي عالي الكوليسترول لـ 24 من جرذان المختبر تتراوح اوزانهم بين 220-280غم.

وقد اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Nasser et al., 2020) عند استعمال الحليب المدعم ببكتيريا حامض اللاكتيك لتقليل تركيز الكوليسترول في مصل دم ذكور الفئران وأشار إلى تأثيره على تركيز الكوليسترول في مصل دم الجرذان. كما اتفقت مع (Jiang et al., 2019) عند تخفيض مستويات

الكوليسترول في مصل دم الجرذان المصابة بفرط الكوليسترول عن طريق تجريعها ببكتريا *L.reuteri* A9. ودرس (Thakkar et al., (2020 تأثير بكتيريا *Lactobacillus* المعزولة من الطعام المخمر على تقليل تركيز الدهون الثلاثية. كما اتفقت مع (Gazal (2020 التي بحثت في تأثير خفض الدهون الثلاثية في مصل دم الجرذان عن طريق إطعامها جبنًا متآزرًا مدعمًا بمزيج من المعززات الحيوية من بكتريا *Lactobacillus* و *Bifidobacterium*.

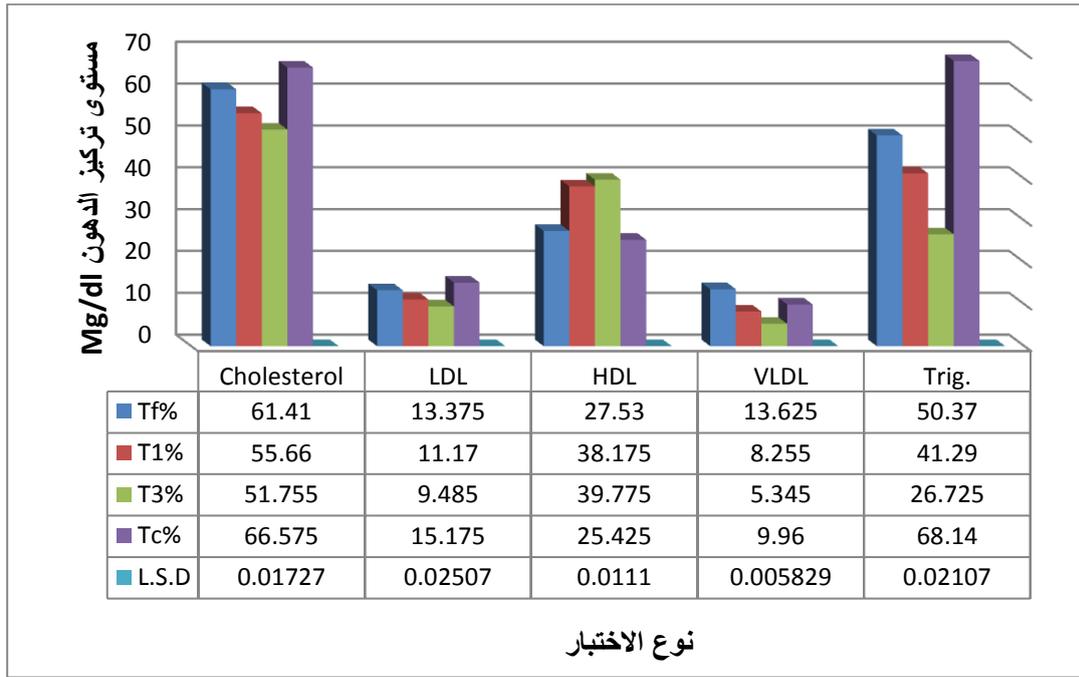
وجد (Palaniyandi et al.,(2019 أن بعض سلالات *L.acidophilus* تستطيع ربط الكوليسترول بتجريف الأمعاء وبالتالي تقليل امتصاصه وهذا يزيد من استعمال الكوليسترول الخلوي ويعزز امتصاص LDL لتقليل الكوليسترول الكلي في المصل وروابط الدهون الأخرى ويسمح بزيادة HDL في مصل الدم للحصول على المزيد من الكوليسترول والعودة إلى الكبد (Ma et al.,2019). وقد يعود السبب إلى أن الانخفاض في مؤشرات الدهون بسبب انخفاض نشاط *AcylCoA:cholesterol*, (ACAT) (*Acyltransferase*) المنظم لنواتج أيض LDL في الكبد) يرتبط بانخفاض إفراز مستوى VLDL ومن ثم أصبحت مستقبلات LDL متاحة للارتباط بـ LDL-C ثم يتم تمثيلها غذائياً (Abdullah et al.,2013).

ويمكن أن تُعزى هذه النتائج إلى تأثير اللبن الرائب المحتوي على المعززات الحيوية الذي تم إعطاؤه للجرذان والذي يحتوي على بكتيريا المعززات الحيوية المغلفة والحرّة والتي بدورها تنتج مركب *hydroxy methyl glutarate* من خلال عملية التخمير. وكذلك وجد (wang et al.,(2018 ان بكتريا حامض اللاكتيك اثناء التخمير تعمل على إنتاج مركب يعرف بـ *hydroxy methyl glutarate* الذي يقوم بتنشيط إنزيم *hydroxymethylglutaryl COA- reductase* الضروري في عملية التخليق الحيوي للدهون وبالتالي خفض الكوليسترول. حيث استطاع خليط من سلالات *Bifido.bacteria* وبكتريا *L.acidophilus* بتقليل مستوى الكوليسترول من 10.44 إلى 6.15 ملغم/ديسيلتر و16.74 إلى

9.80 ملغم/ديسيلتر على التوالي، في النظام الغذائي لدم 179 مصابا، ويعزى هذا الانخفاض لامتلاك هذه السلالات الجين المسؤول عن نشاط إنزيم Bile salt hydrolase المسؤول عن فصل أملاح الصفراء في الدورة الدموية المعوية الكبدية حيث يقوم بتحلل الكوليسترول وربطة على السطح الخلوي للمعززات الخلوية وبالتالي دمجها في جزيئات الغشاء الخلوي أو تحويله إلى سكريات متعددة مثل coprostanol و cholestanol غير قابلين للأبيض وإفرازهما في البراز (Popović *et al.*,2020 ; Kumar *et al.*, 2012).

بينما عزا (Abdullah *et al.*,2013) الانخفاض في الكوليسترول والدهون الثلاثية إلى دور بكتيريا حامض اللاكتيك في تحفيز إنزيم اللابيز المسؤول عن تحلل الدهون الثلاثية أو بسبب قدرة البكتيريا على تحفيز إفراز الأحماض الصفراوية من المرارة، من خلال استهلاك الكوليسترول لتخليق الأحماض الصفراوية ونتيجة لذلك تمنع البكتيريا امتصاص الكوليسترول والدهون الثلاثية من الأمعاء وبالتالي تفرزها مع الفضلات.

وجد (Carlos and Alana (2019) ان تناول الاغذية الوظيفية تسبب في خفض مستوى الدهون الضارة كالكوليسترول والدهون الثلاثية ورفع مستوى الدهون الجيدة في الدم. كما ذكر (Lay-Gaik and Min(2010 ان وجود مستويات كافية من المعززات والمحفزات الحيوية بعدد مستعمرات اعلى من 10^8 وحدة تكوين مستعمرة أمل في امعاء المضيف تؤدي الى خفض الكوليسترول الكلي والضرار والدهون الثلاثية وترفع تركيز الكوليسترول الجيد.



الشكل (4-11) تأثير بكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة على محتوى الدهون الكلية وانواعها في مصل دم حيوانات التجارب.

11-4-2-2-3 تأثير البكتريا المغلفة وغير المغلفة على نشاط انزيمات الكبد AST و ALT.

يوضح الشكل (4-12) حصول تأثير طفيف لبكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة على نشاط

انزيمات الكبد Aspartate aminotransferase (AST) و Alanine (ALT)

aminotransferase، اذ تفوقت مجموعة الجرذان في مجموعة Tc عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$)

على نشاط انزيمات الكبد (AST) و (ALT) وبلغ اعلى نشاط U/L 225.2 لأنزيم AST و 66.34

U/L لأنزيم ALT، مقارنة مع (168.8 و 180.45 و 194.565) U/L لأنزيم AST و (53.82 و

51.505 و 50.5) U/L لأنزيم ALT لمجموعة Tf و T1 و T3 على التوالي. ويلاحظ ان المحافظة على

اعداد مستعمرات بكتريا *L.reuteri* من خلال التغليف تفوق قليلا في زيادة الحالة الصحية للكبد نتيجة لعمل

البكتريا العلاجية ونواتجها الصحية للمضيف.

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Muhammad et al.(2023) اذ وجد انخفاض كبير في تركيز

الانزيمات الكبدية (ALT، AST، و ALP) عند ($P < 0.05$) في الجرذان المختبرية المعالجة بـ Nobiletin

(NOB) وهو مركب polymethoxy flavone, اكتسب مؤخرًا اهتمامًا كبيرًا بسبب آثاره العلاجية) على السمية الكبدية الناتجة من عنصر الزرنيخ (As)، مقارنة بعينة المقارنة.

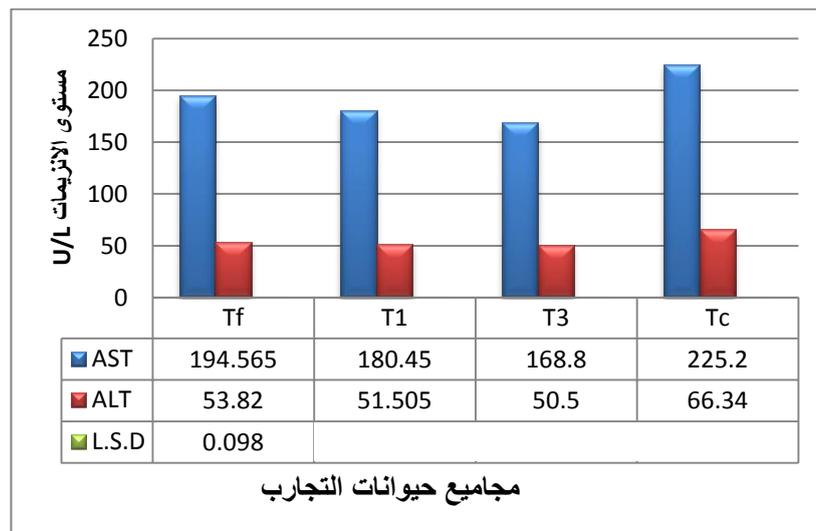
ووجد Nami et al.(2019) أن سلالة *L.plantarum* YS5 المعزولة من اللبن الرائب محلي الصنع قد خفضت مستويات AST و ALT والكوليسترول في الجرذان. كما وجد Amengialue et al.(2023) أن أنواع بكتريا حامض اللاكتيك التي تناولتها الجرذان تسببت في تعديل وظائف الكبد الطبيعية في الجرذان المصابة بالمرض مقارنة بعينة السيطرة التي تتغذى على عليقة قياسية نتيجة لعدم اختلاف نشاط الانزيمات او تركيب البكتريا للجرذان المعاملة بأنواع بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة بشكل عام مقارنة بأنشطة العينة الضابطة. كشفت هذه النتائج عن وجود روابط يمكن الاعتماد عليها بين الحالة الصحية المناعية للجرذان واستهلاك أنواع *Lactobacillus* المعزولة.

اشار Hossain et al.(2017) الى امكانية المعززات الحيوية على ازالة السموم او تعيق من سميتها من خلال الارتباط بالمواد السامة واستعمال التفاعلات الأنزيمية لتفكيكها وإنتاج مركبات امنة مثل إنتاج مضادة الأكسدة مثل الجلوتاثيون والبولات، كما اشار SinghI et al.(2016) الى ان هناك أدلة تشير إلى ان المعززات الحيوية قادرة على تعزيز تخفيض السموم وتمنع التأثيرات السامة للملوثات الكيميائية المحتملة في الحليب ومنتجات الألبان. كما بين González et al.(2020) امتلاك المعززات الحيوية خصائص إزالة السموم والمعادن الثقيلة الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات، الأمينات العطرية الحلقية غير المتجانسة، النيتروزامين وغيرها.

أدى تناول المكملات المحتوية على المعززات الحيوية على المدى الطويل إلى زيادة كبيرة في (AST) في المجموعة التي تناولت مزيجا من هذه المكملات لفترة 8 اشهر، في حين لم يتم ملاحظة أي اختلافات في مستويات (ALP) و (ALT). ولا توجد اي اختلافات في مستويات اليوريا والألبومين بين المجموعات التجريبية (Hradicka et al.,2023).

توصل (2019) Al-Hamdani حول انخفاض إنزيمات الكبد بسبب تأثير أنواع من المعززات الحيوية. وسجل (2017) Asemi *et al.* التأثير المفيد للمعززات الحيوية وقدرته على تنظيم إنزيمات الكبد لدى النساء الحوامل. كما وجدت (2020) Gazal حصول انخفاض في مستويات إنزيمات الكبد ALT و AST في مصل الجرذان التي تتغذى على الجبن التآزري (العلاجي).

اشار (2023) Bibi *et al.* الى حصول فروق ملحوظة بين مستويات alanine transaminase (ALT) aspartate transaminase (AST) في مجموعات الجرذان غير المعاملة والمعاملة بالمعززات الحيوية أي أنه لم يحدث تلف في الكبد بعد علاج المعززات الحيوية. حيث بلغ أعلى تركيز (67.33 و (uL) (57.0) لانزيم ALT وأعلى تركيز (307.0 و 294.6) (uL) لانزيم AST في مجموعة ذكور الجرذان التي تناولت بكتريا *L.plantarum* MZ707748 و *L.plantarum* MZ729681 على التوالي، مقارنة مع (67.00 و 66.0) (uL) و (305.6 و 266.6) (uL) في مجموعة عينة السيطرة على التوالي. وهذا يشير الى ارتفاع مستويات ALT و AST في مجموعة بكتريا *L.plantarum* MZ707748 و انخفاضه في مجموعة بروبايوتك *L.plantarum* MZ729681. في حين انخفض AST في مجموعة بروبايوتك *L.plantarum* MZ729681. وهذه المعايير للأنزيمات تعد ضمن الحدود الفسيولوجية.



الشكل (4-12) تأثير بكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة على نشاط انزيمات الكبد ALT و AST في حيوانات التجارب.

3-2-11-4 الخصائص المعوية

1-3-2-11-4 الدراسة النسيجية

2-3-2-11-4 قياس طول الزغابة وعمق الخبايا(القبو)

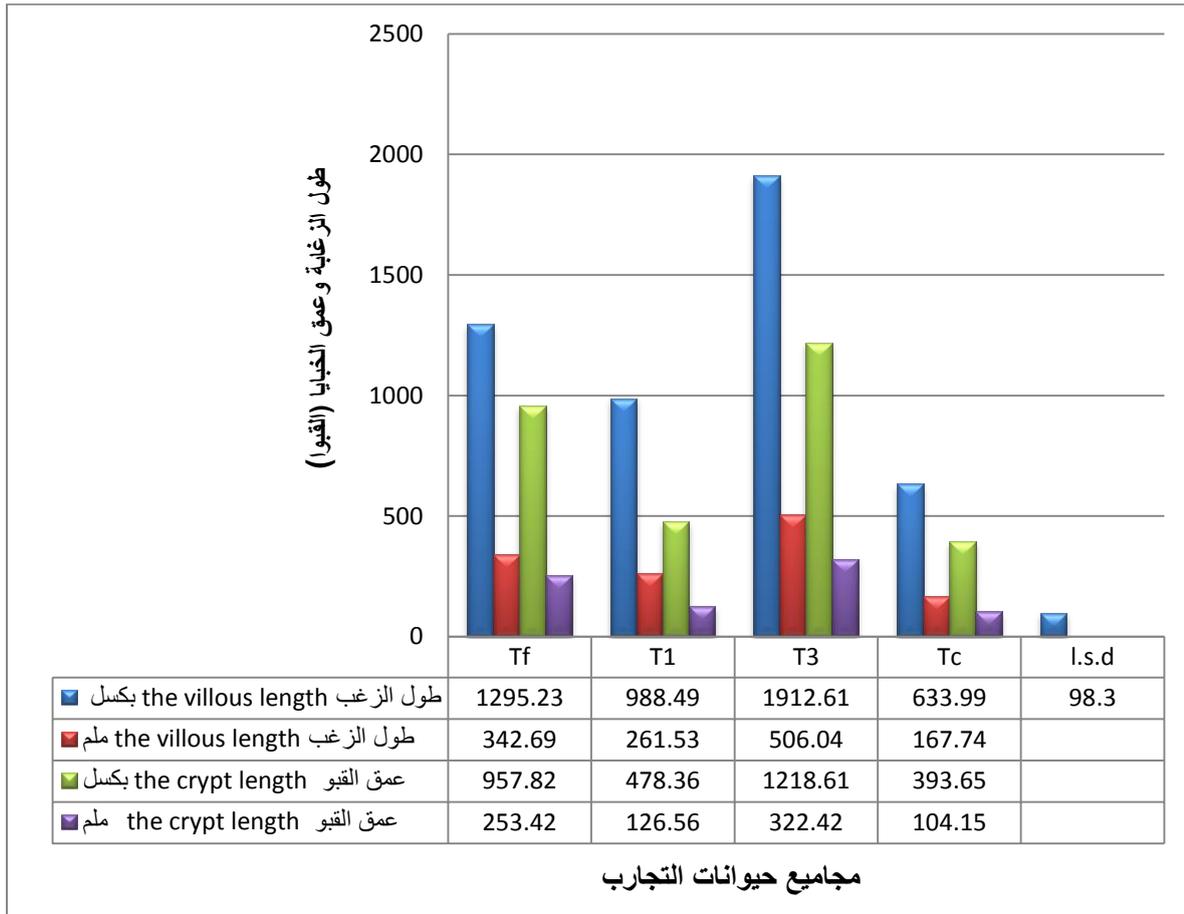
يوضح الشكل (4-13) والشكل (4-14) تفوق مجموعة T3 في طول الزغابة وعمق الخبايا اذ بلغ طول الزغابات 1912.61 بكسل (506.04 ملم) و عمق الخبايا بكسل 1218.61 (322.42 ملم) عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$)، مقارنة مع مجموعة Tc اذ بلغ طول الزغابة فيها 633.99 بكسل (167.74 ملم) وعمق الخبايا 393.65 بكسل (104.15 ملم)، ومجموعة Tf اذ بلغ طول الزغابة فيها 1295.23 بكسل (342.69 ملم) وعمق الخبايا 957.82 بكسل (253.42 ملم). كما اظهرت مجموعة T1 تفوقا معنويا في طول الزغابة وعمق الخبايا مقارنة مع مجموعة Tc. وتؤكد هذه النتائج على محافظة الغلاف للبكتريا العلاجية التي تسببت في زيادة طول الزغابة وعمق الخبايا للبكتريا المغلفة في التركيز 3% بسبب منتجاتها الايضية التي تعيد للمضيف صحته وتوازن فلورا الاحياء المجهرية في الامعاء مما يزيد من مساحة الامتصاص لدى الزغابات والخبايا في الامعاء.

اشار (Vlasova et al. (2016 الى عمل *L.casei* DN-114 001 على تعزيز سلامة الغشاء المخاطي وتقليل عدوى الزغابات المعوية في الجرذان عند تغذيتها على $10^6 \times 8$ وحدة تكوين مستعمرة/مل ضد عدوى فيروس الروتا (المسبب للإسهال) ولوحظ تأخير في زيادة الوزن وتقصير الزغابات والخلايا المعوية التي تحتوي على فجوات. وبالتالي يعزز استهلاك بكتيريا *Lactobacillus*. و وجد (Xie et (2024 *al.* ان تأثير النواتج الايضية التي تنتجها المعززات الحيوية في الجرذان التي تناولت مزيج من المعززات الحيوية من (*Bifid.longum* BL21, *L.paracasei* LC86, *L.plantarum* Lp90, (*Bifid.lactis* BLa80, *L.acidophilus* LA85, *L.rhamnosus* L Ra05) ، لمدة 30 يوماً عن طريق الفم تسببت في زيادة أكبر لطول القولون والزغابات مقارنة بعينة السيطرة.

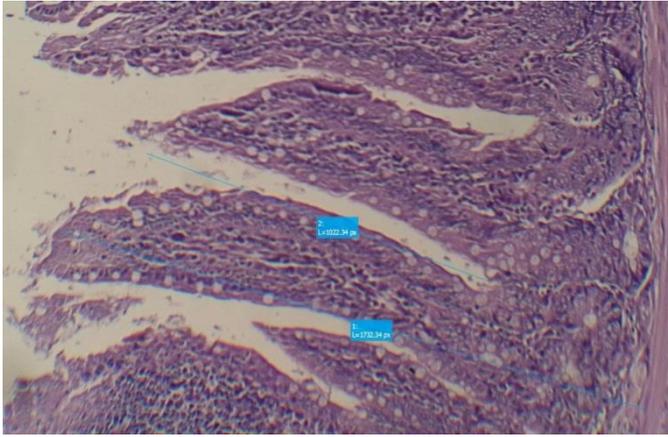
لم يؤثر تناول المعززات الحيوية على زيادة وزن الجسم وطول القولون بشكل كبير في جردان المختبر التي تناولت مزيجًا من المعززات الحيوية (*Lactiplantibacillus plantarum* VD23، *Ligilactobacillus salivarius* MS3، *L.plantarum* MS18، *L.plantarum* C28، *L.salivarius* MS6 و *L.salivarius* MS16)، إذ بلغ طول القولون 21.5 و21.2 سم في مجموعة المعززات الحيوية و عينة السيطرة على التوالي (Hradicka et al., 2023).

وجد (Gryaznova et al. (2024) حصول مواقع التهابية في الغشاء المخاطي المعوي فضلاً عن تقشر الزغابات وإطلاق إفرازات من الخلايا الكأسية والنزيف في المقاطع المعوية التي تم الحصول عليها في مجموعة الجردان التي حقنت بمتعدد السكريات LPS، كما لوحظ انخفاض هذه الالتهابات في مجموعات الجردان التي تناولت مكملات تحتوي على *L.plantarum* وسلالات أخرى عائدة لجنس *Lactobacilli* التجارية بنسبة $10^8 \times 1$ وحدة تكوين مستعمرة/غم، مقارنة مع عدم وجود تغييرات في البنية المورفولوجية للأمعاء في مجموعة الجردان الضابطة.

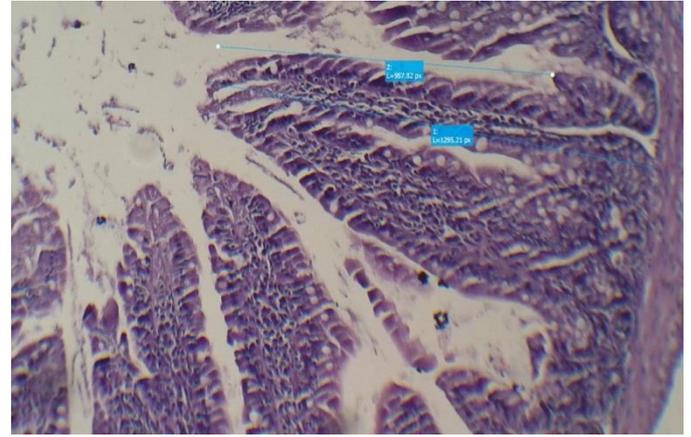
وذكر (Gryaznova et al. (2024) ان زيادة متوسط ارتفاع الزغابات لعينات الأنسجة المعوية بلغت (102.27 و 143.24 و 131.37) في مجموعات الجردان التي تلقت نظامًا غذائيًا مضاف إليه بكتيريا المعززات الحيوية، مقارنة مع 121.24 ميكرون لمجموعة الجردان التي تناولت عليفة قياسية مع الحقن داخل الصفاق بمادة متعدد السكريات الدهنية LPS الذي يسبب التهابات البطانة الغشائية في أمعاء الجردان في الأسبوع الرابع من التجربة بجرعة 375 ميكروغرام/كغم/يوم. في الوقت نفسه كانت قيم مؤشر عمق الخبايا في مجموعة LPS هي الأصغر (7.65) ميكرون. وبذلك، كان الفرق بين المعايير المورفولوجية المعوية في مجموعات البروبيوتك 12.56% مقارنة بمجموعة LPS وكان الفرق الكلي بين مجموعات LPS والمجموعة الضابطة بمقدار 23.3%. وقد تبين سابقاً أن هذه الكمية من بكتيريا حمض اللاكتيك في العلف تعد متوسطة (Bao et al.,2022 ; Ren et al.,2019).



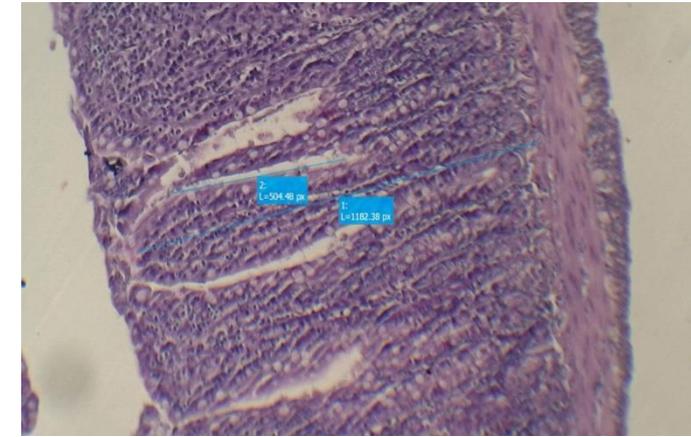
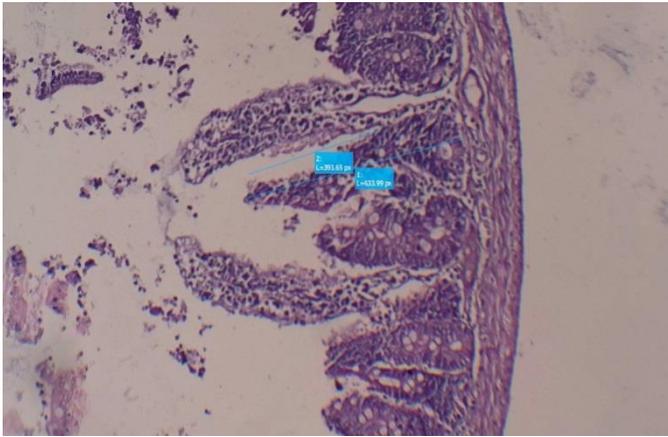
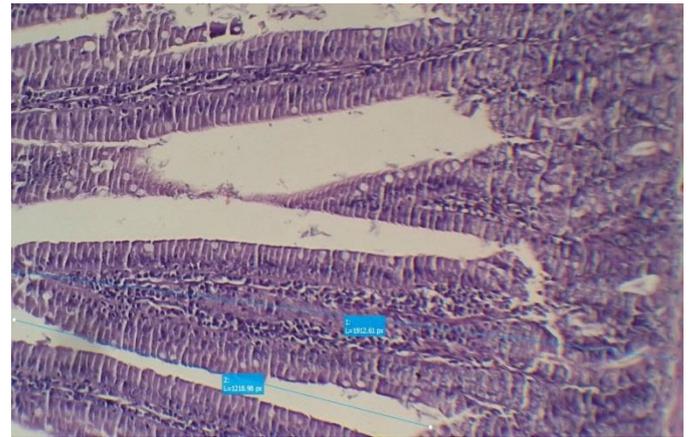
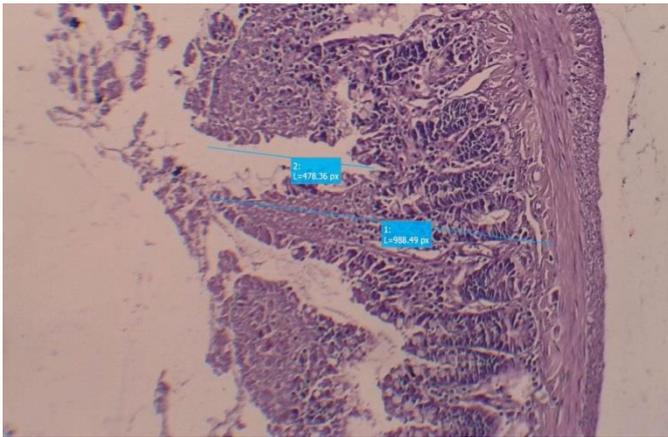
الشكل (4-13) تأثير بكتريا *L.reuteri* المغلفة وغير المغلفة على طول الزغابة وعمق الخبايا في نهاية التجربة.



Tf(1)



Tf(2)



الشكل (4-14): نماذج من الصورة المجهرية للاثني عشري، (HandE stain. 100X) : المجموعة Tf(1) : طول الزغب هو 1732.34 بكسل يساوي 458.34 ملم، بينما عمق القبو 1022.34 يساوي 270.49 ملم. المجموعة Tf(2) : طول الزغب هو 1295.23 بكسل يساوي 342.69 ملم، بينما عمق القبو 957.82 يساوي 253.42 ملم. المجموعة T1 : طول الزغب هو 988.49 بكسل يساوي 261.53 ملم، بينما عمق القبو 478.36 يساوي 126.56 ملم. المجموعة T3 : طول الزغب هو 1912.61 بكسل يساوي 506.04 ملم، بينما عمق القبو 1218.61 يساوي 322.42 ملم. المجموعة Tc، طول الزغب هو 633.99 بكسل يساوي 167.74 ملم، بينما عمق القبو 393.65 يساوي 104.15 ملم. المجموعة Tc(2)، طول الزغب هو 1182.38 بكسل يساوي 167.74 ملم، بينما عمق القبو 504.48 بكسل يساوي 133.47 ملم.

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

1-5 الاستنتاجات Conclusions

- 1- إمكانية استعمال شرش الحليب والصمغ العربي في تكوين غلاف يستعمل في تغليف بكتريا المعززات الحيوية Probiotic بنسب معينة.
- 2- استعمال الصمغ العربي وشرش الحليب المجفف كمواد لتغليف بكتريا *Limosilactobacillus reuteri* تعمل على زيادة عمرها الخزن والمحافظة عليها من المؤثرات الخارجية.
- 3- ان استعمال جهاز التجفيف الفراغي vacuum oven في عملية التغليف الدقيق يحافظ على الخلايا الحية للبكتريا لكونه يستعمل درجات حرارة منخفضة تحت ضغط منخفض وهذا يؤدي الى قلة وقت التجفيف مما يعطي بكتريا مغلقة ذات صلاحية طويلة.
- 4- يمكن ان نستعمل تقنية التجفيف الفراغي vacuum oven على المستوى التجاري لإطالة فترة الخزن لخلايا المعززات الحيوية probiotic والمركبات الفعالة التي تتأثر بالظروف الخارجية.
- 5- حافظ غلاف شرش حليب الجاموس المجفف والصمغ العربي على اعداد مستعمرات البكتريا المغلفة بتقنية التجفيف الفراغي vacuum oven ضد ظروف الهضم الحامضي المعدي والمعوي في المختبر وكذلك ضد املاح الصفراء ودرجات الحرارة الخزن.
- 6- شخص غلاف البكتريا الناتج باستعمال تقنية SEM-EDS وتم معرفة تراكيز العناصر المعدنية المتواجدة في الغلاف.
- 7- حسنت إضافة المعززات الحيوية المغلفة المضافة الى اللبن الرائب الخواص الميكروبية والريولوجية والحسية في المنتج النهائي وخلال مدة الخزن المبرد.
- 8- تجرّيع الحيوانات باللبن الرائب المضاف الية البكتريا المغلفة خفض من مستوى الكلسيريديات الثلاثية والكوليسترول الكلي وزاد من نسبة خلايا كريات الدم الحمراء والبيضاء والهيموغلوبين ومعدل الوزن.

2-5 التوصيات

- 1- استعمال مواد اخرى لتغليف المعززات الحيوية مثل انواع من الاصماغ والكاربوهيدرات وشرش معامل الالبان ومخلفات صناعة الالبان في انتاج كبسولات دقيقة من اجل خفض تكلفة الانتاج.
- 2- تغليف انواع اخرى من المعززات الحيوية واستعمالها في انتاج اغذية وظيفية.
- 3- ادخال بكتريا المعززات الحيوية المغلفة في صناعات غذائية اخرى كاللحوم والمعجنات.
- 4- تغليف الخمائر باستعمال تقنية التجفيف الفراغي vacuum oven واستعمالها في انتاج المعجنات والكحول الطبي.

1-6 المصادر العربية

الدوسكي، عيسى موسى محمد (2007). تأثير التداخل بين نوع ونسبة البادئ والمواد الصلبة اللادهنية في الحليب ومدة الخزن في بعض الصفات النوعية والتركيبية والحسية في لبن الأغنام الناتج. اطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل، 130ص.

الشريفي ، علاء سعد (2016).تحضير حليب الصويا المخمر ودراسة الخصائص الكيميائية والميكروبيولوجية والحسية وتأثيراتها على معايير دم معينة للجرذان.رسالة ماجستير- كلية الزراعة - جامعة البصرة.

عزيز، رغد اكرم ؛ مسلم، سند علاء الدين ؛ المرجاني، محمد فرج (2017). تأثير بروتين اللاكتوفيرين المنقى من حليب الابقار ضد البكتريا المسببة للاسهال عند الاطفال. مجلة كلية التربية الاساسية ، المجلد 23- العدد 98 : 43-56.

علي حمدي وصبيحة احمد (2023). دراسة الخصائص الفيزيائية والوظيفية للصبغ العربي. المجلة السورية للبحوث الزراعية .10(1):11-22.

الفياض ، حمدي عبد العزيز وناجي ، سعد عبد الحسين (1989) تكنولوجيا منتجات الدواجن الطبعة الاولى . مديرية مطبعة التعليم العالي. بغداد.

القصاب، عبد الجبار عمر(1988). التأثير المضاد لبكتريا حامض اللبنيك العصوية على بعض البكتريا المرضية. رسالة ماجستير/قسم الصناعات الغذائية/كلية الزراعة/جامعة بغداد/العراق.

A

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2013).** The role of whey proteins in encapsulating probiotic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7423-7432.
- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2015).** Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy science & technology*, 95, 393-412.
- Abdullah, Kh. Sh., Salih, H. M. & Mohammed, N. F. (2013).** The impact of the yoghurt product by using the lactic acid bacteria (ABT) in reducing the level of lipid profile in blood of rats and increase weights. *Tikrit University Journal of Agricultural Sciences*, 13, 14-22.
- Abesinghe, A. M. N. L., Priyashantha, H., Prasanna, P. H. P., Kurukulasuriya, M. S., Ranadheera, C. S., & Vidanarachchi, J. K. (2020).** Inclusion of probiotics into fermented buffalo (*Bubalus bubalis*) milk: an overview of challenges and opportunities. *Fermentation*, 6(4), 121.
- Abuqwider, J., Altamimi, M., & Mauriello, G. (2022).** *Limosilactobacillus reuteri* in Health and Disease. *Microorganisms*, 10(3), 522.
- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., et al. (2019).** Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Sciences and Nutrition*, 7(12), 3931–3940.

- Afzaal, M., Saeed, F., & Arshad, M. U. (2018).** The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 1348-1354.
- Al – Hamdani, A. H. A. (2019).** The effect of feeding supported skim milk with different types of prebiotic on microbiological and biochemical parameters of rats. A thesis, College of Agriculture, University of Basrah . p:57-103.
- Al-Bedrani, D. I. J. , ALKaisy Q. H. , Rah A. K. , Saadi A. M. (2023).** Evaluation of milk source on physicochemical, texture, rheological and sensory properties of yogurts. *Journal of Applied and Natural Science*, 15(1), 128 - 136. <https://doi.org/10.31018/jans.v15i1.4269>
- Al-Bedrani, D. I., ALKaisy, Q. H., & Mohammed, Z. M. (2019).** Physicochemical, rheological and sensory properties of yogurt flavored with sweet orange (citrus sinensis) marmalade. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 388, No. 1, p. 012052). IOP Publishing.
- Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L. (2010).** Development of microparticulate systems for intestinal delivery of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 233-242
- Al-Daradji, Hazem Jabbar, Al-Hayani, Walid Khaled and Al-Hasani, Ali Sabah (2008).** Avian blood physiology. University of Baghdad, College of Agriculture, 578 pages.
- Aledani, A. H. E., Khudhair, N. A., & Alrafas, H. R. (2020).** Effect of different methods of anesthesia on physiobiochemical parameters in laboratory male rats. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 19(1), 206-214.

- Al-Hamayda, A., Abu-Jdayil, B., Ayyash, M., & Tannous, J. (2023). Advances in microencapsulation techniques using Arabic gum: A comprehensive review. *Industrial Crops and Products*, 205, 117556.
- Al-Hasani, D. H. (2000). Domestic bird physiology. Baghdad, Dar Al-Kutub for printing and publishing. College of Agriculture, University of Baghdad.
- Ali, A. A., Ali, K. E., Fadlalla, A. E., & Khalid, K. E. (2008). The effects of gum arabic oral treatment on the metabolic profile of chronic renal failure patients under regular haemodialysis in Central Sudan. *Natural Product Research*, 22(1), 12-21.
- Ali, A., et al. (2021). Effect of dual-emulsion encapsulation on *Limosilactobacillus reuteri* during gastric and intestinal simulation. *Journal of Applied Microbiology*, 130(1), 1-12.
- Ali, N., & Itsaranuwat, P. (2023). *Survival enhancement of probiotic bacteria by encapsulation with chitosan succinate nano-particles and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions* (Doctoral dissertation, Mahasarakham University).
- Al-Jubori, Y., Ahmed, N. T. B., Albusaidi, R., Madden, J., Das, S., & Sirasanagandla, S. R. (2023). The efficacy of gum Arabic in managing diseases: A systematic review of evidence-based clinical trials. *Biomolecules*, 13(1), 138.
- Allain, T., Chaouch, S., Thomas, M., Vallée, I., Buret, A. G., Langella, P., ... & Grellier, P. (2018). Bile-salt-hydrolases from the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1 mediate anti-giardial activity in *vitro* and in *vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02707>

- Al-Mashikhi, S. A. and Nakai, S.(1987).Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey protein by gel filtrations techniques.*Journal of Dairy Science*, 70:2486-2492.
- Alu'datt, M. H., Alrosan, M., Gammoh, S., Tranchant, C. C., Alhamad, M. N., Rababah, T., ... & Tan, T. C. (2022). Encapsulation-based technologies for bioactive compounds and their application in the food industry: A roadmap for food-derived functional and health-promoting ingredients. *Food Bioscience*, 50, 101971.
- Alvarado-Reveles, O., Fernández-Michel, S., Jiménez-Flores, R., Cueto-Wong, C., Vázquez-Moreno, L., & Montfort, G. R. C. (2019). Survival and goat milk acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulated with agave fructans in a buttermilk protein matrix. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 1340-1347.
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in Health Improvement, Infection Control, and Disease Treatment and Prevention. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), 366-374.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.001>.
- Amengialue, O. O., Igiebor, F. A., Ehiaghe, J. I., PA, E., Omoregie, B. O., Ologbosere, M. E., & Ehiaghe, F. A. (2023). Heamatological, biochemical and histological responses of infected *Rattus albus* (albino Wister rats) fed with probiotics (*Lactobacillus* sp.). *African Journal of Health, Safety and Environment*, 4(1), 34-44.

- Amin, H. M., Hashem, A. M., Ashour, M. S., & Hatti-Kaul, R. (2013).** 1, 2 Propanediol utilization by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, role in bioconversion of glycerol to 1, 3 propanediol, 3-hydroxypropionaldehyde and 3-hydroxypropionic acid. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 11(1), 53-59.*
- Aminlari, L., Shekarforoush, S. S., Hosseinzadeh, S., Nazifi, S., Sajedianfard, J., & Eskandari, M. H. (2019).** Effect of probiotics *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on lipid profile and feces bacteria of rats fed cholesterol-enriched diet. *Probiotics and antimicrobial proteins, 11, 1163-1171.*
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007).** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology, 18(5), 240-251.*
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., & Rani, R. P. (2020).** Corrigendum to “effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review”. *Chinese Journal of Biology, 2020(1), 8236703.*
- Angiolillo, L., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2017).** Microencapsulated *Lactobacillus reuteri* combined with modified atmosphere as a way to improve tuna burger shelf life. *International Journal of Food Science & Technology, 52(7), 1576-1584.*
- AOAC.(2008).** Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 19th Edition.

- Aptekmann, K. O.; Baraldi Arton, S. M.; Stefanine, M. A. and Orsi, M. A. (2001).** Morphometric analysis of the intestine of domestic quails (Coturnix coturnix japonica) treated with different levels of dietary. Calcium. *Anat. Histol. Embryol.* 30:277-280.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019).** Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Lwt*, 99, 583-593.
- Arepally, D., Reddy, R. S., & Goswami, T. K. (2020).** Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 016 cells by spray drying: Characterization, survival after in vitro digestion, and storage stability. *Food & function*, 11(10), 8694-8706.
- Asemi, Z.; Arabi, M. H.; Hajijafari, M.; Alizadeh, S. A.; Razzaghi, R.; Mazoochi, M., and Esmailzadeh, A. (2017).** Effect of symbiotic Food Consumption on Serum Mineral, Liver Enzymes, and Blood Pressure in Patient with Type 2 Diabetes : A Double-blind Randomized Cross-over Controlled Clinical Trial. *International Journal of Preventive Medicine*, 8(43):1-6.
- Awadh, I. A. J., & Zangana, B. S. R. (2020).** The effect of adding different levels of astaxanthin on the productive performance of broilers chicken reared under high environmental temperatures. *Plant Arch*, 20, 4069-4075.
- Ayed, M. A., & Hamada, T. H. (2017).** Effect of fermented skim milk fortified with probiotic bacteria on some physiological parameters in growing male rats. *Kirkuk University Journal For Agricultural Sciences (KUJAS)*, 8(2).

- Bakry, A. M., Fang, Z., Ni, Y., Cheng, H., Chen, Y. Q., & Liang, L. (2016). Stability of tuna oil and tuna oil/peppermint oil blend microencapsulated using whey protein isolate in combination with carboxymethyl cellulose or pullulan. *Food Chemistry*, 207, 245-254.
- Bambace, M. F., Alvarez, M. V., & del Rosario Moreira, M. (2019). Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International*, 122, 653-660.
- Bao, W., He, Y., Yu, J., Liu, M., Yang, X., Ta, N., ... and Liang, C. (2022). Regulatory effect of *Lactiplantibacillus plantarum* 2-33 on intestinal microbiota of mice with antibiotic-associated diarrhea. *Frontiers in Nutrition*, 9, 921875.
- Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2023). Recent advances in probiotic encapsulation to improve viability under storage and gastrointestinal conditions and their impact on functional food formulation. *Food Reviews International*, 39(2), 992-1013.
- Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Jurkiewicz, C. H., & Franco, B. D. (2015). Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 47, 147-153.
- Bauer, S. A. W., Schneider, S., Behr, J., Kulozik, U., & Foerst, P. (2012). Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. *Journal of Biotechnology*, 159(4), 351-357.

- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 625–651.
- Bibi, Z., Ashraf, K., Shehzadi, A., Rehman, A., & Bukhari, D. A. (2023).** Evaluation of isolated probiotics on the efficacy of immune system in male and female Wistar rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(6), 1036-1046.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013).** Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.
- Bis-Souza, C. V., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Penna, A. B., & Barretto, A. C. S. (2019).** New strategies for the development of innovative fermented meat products: a review regarding the incorporation of probiotics and dietary fibers. *Food Reviews International*, 35(5), 467-484.
- Blasi, P., Luca, G., Mancuso, F., Schoubben, A., Calvitti, M., Giovagnoli, S., ... & Calafiore, R. (2013).** Conformal polymer coatings for pancreatic islets transplantation. *International journal of pharmaceutics*, 440(2), 141-147.
- Bošnjak, A. (2023).** *The role of limosilactobacillus reuteri strains on human health* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. School of Medicine).
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016).** Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International journal of pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.
- 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.

Burgain, J., Petit, J., Scher, J., Rasch, R., Bhandari, B., & Gaiani, C. (2017). Surface chemistry and microscopy of food powders. *Progress in Surface Science*, 92(4), 409-429.

C

Cabuk B, Harsa ST(2015). Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under *in vitro* gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. *J. Biosci. Bioeng.* 120: 650-656.

Campbell, T. W.(1995): Avian Hematology and Cytology, **Second Edition**. Iowa State University Press. pp 7-11

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., de Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. (2019). Effect of different strategies of *Lactobacillus plantarum* incorporation in chorizo sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(15), 6706-6712.

Çelem, E. (2023). Elektrospinning Tekniğiyle Portakal ve Kivi Posalarından Üretilen Nanoliflerle Enkapsüle Edilen Probiyotik *Lactobacillus Acidophilus'* un Fonksiyonel Yoğurt Üretiminde Kullanımı.

Çelik, A., & Turgay, M. (2021). Characterization of microcapsules prepared by encapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM17938 in alginate and fructooligosaccharide. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3294-3303.

Chandramouli V.; Kailasapathy K.; Peiris P. and M. Jones (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.

- Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Chen M.-J., Tang H.-Y. and Chiang M.-L. (2017). Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. *Food Microbiology*, **66**, 20–27.
- Chitprasert, P., Sudsai, P., & Rodklongtan, A. (2012). Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydrate polymers*, **90**(1), 78-86.
- Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, **2**(4), 426-442.
- Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The role of dietary phenolic compounds in protein digestion and processing technologies to improve their antinutritive properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **17**(1), 82-103.
- Coles, E. H. (1986). *Veterinary clinical pathology*. 4th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Riode Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong.
- Colín-Cruz, M. A., Pimentel-González, D. J., Carrillo-Navas, H., Alvarez-Ramírez, J., & Guadarrama-Lezama, A. Y. (2019). Co-encapsulation of bioactive compounds from blackberry juice and probiotic bacteria in biopolymeric matrices. *Lwt*, **110**, 94-101.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics using whey protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 64-70.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Controlled Release*, 162, 56–67.

Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., & Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 2280-2282.

D

Dahiya, D., Terpou, A., Dasenaki, M., & Nigam, P. S. (2023). Current status and future prospects of bioactive molecules delivered through sustainable encapsulation techniques for food fortification. *Sustainable Food Technology*, 1(4), 500-510.

Damodaran, S.; Parkin, K.L. & Fennema, O.R. (2017). Fennema's Food Chemistry, 5th ed., C.R.C. Press, Taylor and Francis Gp, Boca Raton, F.L.: 1125pp.

Dauqan, E., & Abdullah, A. (2013). Utilization of gum arabic for industries and human health. *American Journal of Applied Sciences*, 10(10), 1270.

De Carla Dias, D., Tachibana, L., Iwashita, M. K. P., Nakandakare, I. B., Romagosa, E., Seriani, R., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2020). Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42, 1-9.

- De Matos-Jr, F. E., da Silva, M. P., Kasemodel, M. G. C., Santos, T. T., Burns, P., Reinheimer, J., ... & Favaro-Trindade, C. S. (2019). Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. *Journal of Functional Foods*, *54*, 98-108.
- De Moraes, F. P., Pessato, T. B., Rodrigues, E., Mallmann, L. P., Mariutti, L. R., & Netto, F. M. (2020). Whey protein and phenolic compound complexation: Effects on antioxidant capacity before and after in vitro digestion. *Food Research International*, *133*, 109104.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT-Food Science and Technology*, *61*(2), 452-462.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, *20*(4), 292-302.
- Dean, A., and Voss, D. (1999). *Design and analysis of experiments*. New York, NY: Springer New York.
- Dias, C. O., DE ALMEIDA, J. D. S. O., Pereira, J. A., Vieira, M., & Amboni, R. D. D. M. C. (2018). Microencapsulation of Bifidobacterium BB-12 in passion fruit juice: evaluation of survival under simulated gastrointestinal conditions.
- Diaz, J. T., Foegeding, E. A., Stapleton, L., Kay, C., Iorizzo, M., Ferruzzi, M. G., & Lila, M. A. (2022). Foaming and sensory characteristics of protein-polyphenol particles in a food matrix. *Food Hydrocolloids*, *123*, 107148.

- Dicksved, J., Schreiber, O., Willing, B., Petersson, J., Rang, S., Phillipson, M., ... & Roos, S. (2012). *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PLOS ONE*, 7 (9), e46399
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *Lwt*, 116, 108501.
- Do Carmo, C. S., Maia, C., Poejo, J., Lychko, I., Gamito, P., Nogueira, I., ... & Duarte, C. M. (2017). Microencapsulation of α -tocopherol with zein and β -cyclodextrin using spray drying for colour stability and shelf-life improvement of fruit beverages. *RSC advances*, 7(51), 32065-32075.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 231-241.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452-490.

E

- Eckert, C., Serpa, V. G., dos Santos, A. C. F., da Costa, S. M., Dalpube, V., Lehn, D. N., & de Souza, C. F. V. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. *LWT-food science and technology*, 82, 176-183.

- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2015). Co-encapsulation of omega-3 fatty acids with probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules: Effects of lipid composition. *Journal of Functional Foods, 19*, 882-892.
- Eslamparast, T., Poustchi, H., Zamani, F., Sharafkhah, M., Malekzadeh, R., & Hekmatdoost, A. (2014). Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *The American journal of clinical nutrition, 99*(3), 535-542

F

- FAO, W. (2006). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food Nutr. Pap, 85*(2).
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.*
- Fazilah, N. F., Hamidon, N. H., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Wasoh, H., & Halim, M. (2019). Microencapsulation of Lactococcus lactis Gh1 with gum arabic and synsepalum dulcificum via spray drying for potential inclusion in functional yogurt. *Molecules, 24*(7), 1422.
- Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., & Santivarangkna, C. (2012). Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium Lactobacillus paracasei F19. *Food and Bioproducts Processing, 90*(2), 295-300.

- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2021). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1515-1536.
- Frese, S. A., MacKenzie, D. A., Peterson, D. A., Schmaltz, R., Fangman, T., Zhou, Y., ... & Walter, J. (2013). Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont. *PLoS genetics*, 9(12), e1004057.
- Fyfe, K., Kravchuk, O., Nguyen, A. V., Deeth, H., & Bhandari, B. (2011). Influence of dryer type on surface characteristics of milk powders. *Drying Technology*, 29(7), 758-769.

G

- Gallaher, D. D., Stallings, W. H., Blessing, L. L., Busta, F. F., & Brady, L. J. (1996). Probiotics, Cecal Microflora, and Aberrant Crypts in the Rat Colon^{1, 2}. *The Journal of nutrition*, 126(5), 1362-1371.
- Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2003). Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1305-1307.
- Gao, J., Li, X., Zhang, G., Sadiq, F. A., Simal-Gandara, J., Xiao, J., & Sang, Y. (2021). Probiotics in the dairy industry—Advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3937-3982.
- García-Ceja, A., 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.

- Garvey, et al. (1977). Procedures for the preparation of peptone water solutions. *Journal of Microbial Methods*, 3, 167-178.
- Garvey, G., Mohamed, A., & Menzies, K. (2013). Trehalose enhances survival of probiotic bacteria during storage. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7423-7432.
- Gazal, M. M. (2020). Manufacturing of Synbiotic dairy products using different types of milk and studying the Effect of Synbiotic Cheese in Laboratory Mice. *College of Agriculture, University of Basrah*. p:61-150
- Gentile, C. L., & Weir, T. L. (2018). The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*, 362(6416), 776-780.
- Gilbert, A., Rioux, L. E., St-Gelais, D., & Turgeon, S. L. (2020). Characterization of syneresis phenomena in stirred acid milk gel using low frequency nuclear magnetic resonance on hydrogen and image analyses. *Food Hydrocolloids*, 106, 105907.
- Gils, P. S., Ray, D., & Sahoo, P. K. (2010). Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. *International journal of biological macromolecules*, 46(2), 237-244.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, 161(6), 480-487.
- González-Sanguino, C., Ausín, B., Castellanos, M. Á., Saiz, J., Lópe Gómez, A., Ugidos, C., & Muñoz, M. (2020). Mental health consequences during the initial stage of the 2020 Coronavirus pandemic (COVID-19) in Spain. *Brain, behavior, and immunity*, 87, 172-176.

- Grand View Research. (2019).** Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Food & Beverages, Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2019 – 2025
- Greifová, G., Májeková, H., Greif, G., Body, P., Greifová, M., & Dubničková, M. (2017).** Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia microbiologica*, **62**, 515-524.
- Greppi, A., Asare, P. T., Schwab, C., Zemp, N., Stephan, R., & Lacroix, C. (2020).** Isolation and comparative genomic analysis of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* from the chicken gastrointestinal tract. *Frontiers in microbiology*, **11**, 1166.
- Gryaznova, M., Burakova, I., Smirnova, Y., Morozova, P., Chirkin, E., Gureev, A., Mikhaylov, Evgeny., Korneeva, O. and Syromyatnikov, M. (2024).** Effect of Probiotic Bacteria on the Gut Microbiome of Mice with Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Microorganisms*, **12(7)**, 1341.
- Gu, Y., Wang, C., Qin, X., Zhou, B., Liu, X., Liu, T., ... & Cao, H. (2022).** *Saccharomyces boulardii*, a yeast probiotic, inhibits gut motility through upregulating intestinal serotonin transporter and modulating gut microbiota. *Pharmacological research*, **181**, 106291.
- Guérin, C., Dewolf, Y., & Lautridou, J. P. (2003).** Révision d'un site paléontologique célèbre: Saint-Prest (Chartres, France). *Geobios*, **36(1)**, 55-82.

Guimarães, A., Abrunhosa, L., Pastrana, L. M., & Cerqueira, M. A. (2018). Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: A new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 594-614.

H

Hair – Bejo, M.; Salina, S.; Hafiza, H. and Julaida, S. (2000). In ovo vaccination against infections bursal disease in broiler chicken. *J. Vet. Malaysia*. 12: 63 - 69.

Halabi, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., Dupont, D., and Deglaire, A. (2020). Modification of protein structures by altering the whey protein profile and heat treatment affects in vitro static digestion of model infant milk formulas. *Food and Function*, 11(4), 6933–6945.

Haldar, L., & Gandhi, D. N. (2020). Development of vacuum-dried probiotic milk powder with *Bacillus coagulans*. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 283-291.

Harel, M., & Tang, Q. (2014). Protection and Delivery of Probiotics for Use in Foods. U: Microencapsulation in the Food Industry. *Gaonkar, AG, Vasisht, N., Khare, AR, Sobel, R., ured.*), Elsevier, San Diego, London, 469-482.

Hayashi, H., Kumazawa, E., Saeki, Y., & Lahicka, Y. (1983). Continuous vacuum dryer for energy saving. *Drying Technology*, 1(2), 275-284.

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506-514.
- Hong, S. M., Chung, E. C., & Kim, C. H. (2015). Anti-obesity effect of fermented whey beverage using lactic acid bacteria in diet-induced obese rats. *Korean journal for food science of animal resources*, *35*(5), 653.
- Hongpattarakere, T., & Uraipan, S. (2015). Bifidogenic characteristic and protective effect of saba starch on survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17AN2 during vacuum-drying and storage. *Carbohydrate polymers*, *117*, 255-261.
- Hoobin, P., Burgar, I., Zhu, S., Ying, D., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2013). Water sorption properties, molecular mobility and probiotic survival in freeze dried protein-carbohydrate matrices. *Food & function*, *4*(9), 1376-1386.
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S. D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food research international*, *100*, 63-73.
- Hou, C., Zeng, X., Yang, F., Liu, H., & Qiao, S. (2015). Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, *6*, 1-8.
- Hradicka, P., Adamkova, P., Lenhardt, L., Gancarcikova, S., Iannaccone, S. F., & Demeckova, V. (2023). Addressing safety concerns of long-term probiotic use: In vivo evidence from a rat model. *Journal of Functional Foods*, *104*, 105521.

- Huang, C., Qiao, S., Li, D., Piao, X., & Ren, J. (2004).** Effects of Lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *17*(3), 401-409.
- Hurst, S., Aplin, R. D., & Barbano, D. M., (1990).** *Whey powder and whey protein concentrate production technology, costs and profitability. Research Bulletins 183289.* Ithaca, NY, USA: Cornell University, Department of Applied Economics and Management.
- Hussain, A., Rui, B., Ullah, H., Dai, P., Ahmad, K., Yuan, J., ... & Li, M. (2024).** *Limosilactobacillus reuteri* HCS02-001 Attenuates Hyperuricemia through Gut Microbiota-Dependent Regulation of Uric Acid Biosynthesis and Excretion. *Microorganisms*, *12*(4), 637.

I

- Iatcu, C. O., Steen, A., & Covasa, M. (2021).** Gut microbiota and complications of type-2 diabetes. *Nutrients*, *14*(1), 166.
- Ibrahim, D., & Doosh, K. S. (2017).** Physicochemical and sensorial properties of low energy yogurt produced by adding whey protein concentrate. *Iraq journal of agricultur-al research*, *22*(5)
- Idan, M. A., Khudhair, N. A., & Al-Shawi, S. G. (2024).** Study the Therapeutic Effect of Grape-Flavored Whey Probiotic Beverage on Hypercholesterolemia induced in male laboratory rats. *Dijlah Journal of Agricultural Sciences*, *2*(2), 112-124.
- Islam, S. U. (2016).** Clinical uses of probiotics. *Medicine*, *95*(5), e2658.

- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying technology*, 26(7), 816-835.
- Jannah, M., Junaidi, M., Setyowati, D. N. A., Setyowati, D. N. A., & Fariq Azhar, F. A. (2018). Pengaruh pemberian *Lactobacillus* sp. Dengan dosis yang berbeda terhadap sistem imun udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. *Jurnal Kelautan*, 11(2), 140-150.
- Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 1029-1036.
- Jayaprakash, P., Gaiani, C., Edoth, J. M., Borges, F., Beaupeux, E., Maudhuit, A., & Desobry, S. (2023). Comparison of Electrostatic Spray Drying, Spray Drying, and Freeze Drying for *Lactobacillus rhamnosus* GG Dehydration. *Foods*, 12(16), 3117.
- Jiang, H., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Lim, R. X. (2014). Comparison of drying characteristic and uniformity of banana cubes dried by pulse-spouted microwave vacuum drying, freeze drying and microwave freeze drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1827-1834.
- Jiang, J., Feng, N., Zhang, C., Liu, F., Zhao, J., Zhang, H., ... & Chen, W. (2019). *Lactobacillus reuteri* A9 and *Lactobacillus mucosae* A13 isolated from Chinese superlongevity people modulate lipid metabolism in a hypercholesterolemia rat model. *FEMS microbiology letters*, 366(24), fnz254.

Jones, M. L., Martoni, C. J., Tamber, S., Parent, M., & Prakash, S. (2012). Evaluation of safety and tolerance of microencapsulated *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 in a yogurt formulation: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2216-2223.

K

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 39-48.

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CABI Reviews*, (2009), 1-19.

Kajal Farahmandi, Shadi Rajab, Fatemeh Tabandeh, Mahvash Khodabandeh Shahraky, Amir Maghsoudi, Morahem Ashengroph (2021). Efficient Spray-Drying of *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 Using Total CFU yield as the decision factor. *Food Bioscience* (40) , 100816

Kandler, O., Stetter, K. O., & Köhl, R. (1980). *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. *Zentralblatt Für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte Und Ökologische Mikrobiologie*, 1(3), 264-269.

Karimi, M., Sekhavatizadeh, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2021). Milk dessert containing *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272) encapsulated with sodium alginate, *Ferula assa-foetida* and Zedo (*Amygdalus scoparia*) gum as three layers of wall materials. *Food and Bioproducts Processing*, 127, 244-254.

- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1-7.
- Khem, S., Small, D. M., & May, B. K. (2016). The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food chemistry*, 190, 717-723.
- Kia, E. M.; Ghasempour, Z. ; Ghanbari, S. ; Pirmohammadi, R. and A. Ehsani (2018).Development of probiotic yogurt by incorporation of milk protein concentrate (MPC) and microencapsulated *Lactobacillus paracasei* in gellan-caseinate mixture. *British Food Journal*, 120 (7), 1516–1528.
- Kieps, J., & Dembczyński, R. (2022). Current trends in the production of probiotic formulations. *Foods*, 11(15), 2330.
- Kim W. S., Perl L., Park J. H., Tandianus J. E. and Dunn N. W. (2001). Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43(5), 346–350.
- Kim, H. J., Kim, H. S., & Lee, M. J. (2006). Effect of heat and NaCl on the growth and survival of probiotic bacteria during yogurt fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 459-464.
- Kim, S. H., Kim, S. H., Kang, K. H., Lee, S., Kim, S. J., Kim, J. G., & Chung, M. J. (2017). Kimchi probiotic bacteria contribute to reduced amounts of N-nitrosodimethylamine in lactic acid bacteria-fortified kimchi. *LWT*, 84, 196-203.
- Kim, S. Y., Hyeonbin, O., Lee, P., & Kim, Y. S. (2020). The quality characteristics, antioxidant activity, and sensory evaluation of reduced-fat yogurt and nonfat yogurt supplemented with basil seed gum as a fat substitute. *Journal of dairy science*, 103(2), 1324-1336.

- Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological reviews*, 279(1), 90-105.
- King, V. A. E., Zall, R. R., & Ludington, D. C. (1989). Controlled Low-Temperature Vacuum Dehydration—A New Approach for Low-Temperature and Low-Pressure Food Drying. *Journal of food science*, 54(6), 1573-1579.
- Korčok, D. J., Tršić-Milanović, N. A., Ivanović, N. D., & Đorđević, B. I. (2018). Development of probiotic formulation for the treatment of iron deficiency anemia. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 66(4), 347-352.
- Kroeze, W. K., & Tanner, C. E. (1987). Echinococcus multilocularis: susceptibility and responses to infection in inbred mice. *International journal for parasitology*, 17(4), 873-883.
- Krumbeck, J. A., Marsteller, N. L., Frese, S. A., Peterson, D. A., Ramer-Tait, A. E., Hutkins, R. W., & Walter, J. (2016). Characterization of the ecological role of genes mediating acid resistance in *Lactobacillus reuteri* during colonization of the gastrointestinal tract. *Environmental microbiology*, 18(7), 2172-2184.
- Krunić, T. S., Nikolić, V. D., Savić, I. M., & Nikolić, L. B. (2019). Influence of different protective agents on the viability of probiotic bacteria during freeze-drying and storage. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84(1), 79-89.
- Kšonžeková, P., Bystrický, P., Vlčková, S., Pätoprstý, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., & Tkáčiková, Ľ. (2016). Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response. *Carbohydrate polymers*, 141, 10-19.

- Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016).** Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, *194*, 569-576.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., ... & Yadav, H. (2012).** Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Journal of Diabetes Research*, *2012(1)*, 902917.

L

- Lang, M. G., Vinagre, C. G., Bonfa, E., Freitas, F. R., Pasoto, S. G., Brito, T. S., ... & Borba, E. F. (2022).** Hydroxychloroquine increased cholesterol transfer to high-density lipoprotein in systemic lupus erythematosus: A possible mechanism for the reversal of atherosclerosis in the disease. *Lupus*, *31(6)*, 659-665.
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., ... & Korma, S. A. (2023).** Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1216674.
- Lay-Gaik, L., & Min, W. (2010).** Effects of probiotics and prebiotics on cholesterol levels. *Journal of Functional Foods*, *4(2)*, 121-130.
- Leylak, C., Özdemir, K. S., Gurakan, G. C., & Ogel, Z. B. (2021).** Optimisation of spray drying parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum Arabic: Its application in yoghurt. *International Dairy Journal*, *112*, 104865.

- Li, H., Liu, T., Yang, J., Wang, R., Li, Y., Feng, Y., ... & Yu, J. (2021). Effect of a microencapsulated synbiotic product on microbiology, microstructure, textural and rheological properties of stirred yogurt. *Lwt*, *152*, 112302.
- Li, X. J., Yue, L. Y., Guan, X. F., & Qiao, S. Y. (2008). The adhesion of putative probiotic *lactobacilli* to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied microbiology*, *104*(4), 1082-1091.
- Lima, G, K, D, C., Kruger, M, F., Behrens, J., Destro, M, T., Landgraf, M., Franco, B, D. (2009). Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*. *LWT - Food Science and Technology*, *42*, 491–495.
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., & Tsen, H. Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, *13*(3-4), 107-113.
- Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Ma, J., ... & Wang, Q. (2016). Incorporation of polysaccharides into sodium caseinate-low melting point fat microparticles improves probiotic bacterial survival during simulated gastrointestinal digestion and storage. *Food hydrocolloids*, *54*, 328-337.
- Liu, X. T., Hou, C. L., Zhang, J., Zeng, X. F., & Qiao, S. Y. (2014). Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying. *Letters in applied microbiology*, *59*(4), 398-403.
- Liu, Y., Fatheree, N. Y., Mangalat, N., & Rhoads, J. M. (2010). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal

inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*.

Lorenzen, P. C., & Schrader, K. (2006). A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Le Lait*, 86(4), 259-271.

Luigi Liotta, Vincenzo Lopreiato, Fariborz Asroosh and Alireza Seidavi (2022). Physicochemical and Mineral Content of Milk from Talesh Buffalos, Sheep, Goats, and Cows, Saanen Goats and Talesh-Mediterranean Buffalos: A Comparative Analysis. *Pakistan J. Zool.*, pp 1-8.

M

Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., & Lv, J. (2019). Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2073.

Maciel, G. M., Chaves, K. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. *Journal of dairy science*, 97(4), 1991-1998.

Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465-470.

- Mandal S., Puniya A. K. and Singh K. (2006)** .Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298.*International Dairy Journal*, 16(10), 1190–1195.
- Huang, R. M., Feng, K., Li, S. F., Zong, M. H., Wu, H., & Han, S. Y. (2021).** Enhanced survival of probiotics in the electrosprayed microcapsule by addition of fish oil. *Journal of Food Engineering*, 307, 110650.
- Mariod, A. A. (2018).** Functional properties of gum Arabic. In *Gum Arabic* (pp. 283-295). Academic Press.
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017).** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015).** Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative food science & emerging technologies*, 27, 15-25.
- Martinez, R. C., Seney, S. L., Summers, K. L., Nomizo, A., De Martinis, E. C., & Reid, G. (2009).** Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiology and immunology*, 53(9), 487-495.
- Masuelli, M. A. (2013).** Hydrodynamic properties of whole arabic gum. *American Journal of Food Science and Technology*, 1(3), 60-66
- Mathivanan, K., Selva, R., Chandirika, J.U., Govindarajan, R.K., Srinivasan, R., Annadurai, G., Duc, P.A., (2019).** Biologically synthesized silver nanoparticles against pathogenic bacteria: Synthesis, calcination and characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 22,101373.

- McMillan, A., Dell, M., Zellar, M. P., Cribby, S., Martz, S., Hong, E., ... & Reid, G. (2011). Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 58-64.
- Mehra, R., Kumar, S., Singh, R., Kumar, N., Rathore, D., Nayik, G. A., ... & Kumar, H. (2022). Biochemical, dielectric and surface characteristics of freeze-dried bovine colostrum whey powder. *Food Chemistry: X*, 15, 100364.
- Merlin Junior, I. A., Sifuentes dos Santos, J., Grecco Costa, L., Grecco Costa, R., Ludovico, A., de Almeida Rego, F. C., & Walter de Santana, E. H. (2015). Sheep milk: physical-chemical characteristics and microbiological quality. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 65(3), 193-198.
- Metchnikoff, E. (1907). The health effects of fermented dairy in longevity. *Journal of Bacteriology*, 15(4), 232-245.
- Mina Popović, Marijana Stojanović, Zlate Veličković, Ana Kovačević, Radmila Miljković, Nemanja Mirković, Aleksandar Marinković(2021). Characterization of potential probiotic strain, *L.reuteri* B2, and its microencapsulation using alginate-based biopolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 183, 423-434
- Mis Solval, K. E., Cavender, G., Jiang, N., Chen, J., & Singh, R. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-1927 with skim milk processed via ultra-high-pressure homogenization. *Molecules*, 25(17), 3863.
- Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 340-351.

- Molina, V. C., Medici, M., Taranto, M. P., and Font de Valdez, G. (2009). *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B deficiency. *J. Appl. Microbiol.* *106*, 467–473.
- Montalban-Arques, A., De Schryver, P., Bossier, P., Gorkiewicz, G., Mulero, V., Gatlin III, D. M., & Galindo-Villegas, J. (2015). Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Frontiers in Immunology*, *6*, 512.
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in microbiology*, *9*, 757.
- Muhammad Umar Ijaz , Aqsa Ahmed , Khalid Abdullah Al-Ghanim , Fahad Al-Misned , Mian Nadeem Riaz , Zahid Ali Kaimkhani and Shahid Mahboob(2023). Evaluation of the Possible Protective Role of Nobiletin against Arsenic-Induced Liver Damage in Male Albino Rats. *Toxics*, *11*, 110.
- Muhoza, B., Yuyang, H., Uriho, A., Harindintwali, J. D., Liu, Q., & Li, Y. (2023). Spray-and freeze-drying of microcapsules prepared by complex coacervation method: A review. *Food Hydrocolloids*, *140*, 108650.
- Mukai, T., Asasaka, T., Sato, E., Mori, K., Matsumoto, M., & Ohori, H. (2002). Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *32*(2), 105-110.

N

- Nag, A., & Das, S. (2013). Impact of vitamin E supplementation on the viability of probiotic bacteria. *Journal of Dairy Science*, *96*(4), 2339-2347.

- Nale, Z., Tontul, I., Aşçi Arslan, A., Sahin Nadeem, H., & Kucukcetin, A. (2018). Microbial viability, physicochemical and sensory properties of kefir microcapsules prepared using maltodextrin/Arabic gum mixes. *International Journal of Dairy Technology*, *71*, 61-72.
- Nami, Y., Bakhshayesh, R. V., Manafi, M., & Hejazi, M. A. (2019). Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt. *LWT*, *111*, 876-882.
- Nasiri, H., Golestan, L., Shahidi, S. A., & Darjani, P. (2021). Encapsulation of *Lactobacillus casei* in sodium alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using wild sage seed mucilage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*, 4726-4734.
- Nasrazadani, S., & Hassani, S. (2016). Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries. *Handbook of materials failure analysis with case studies from the oil and gas industry*, 39-54.
- Nasser, A., Siddiqui, R. A., & Khattak, M. S. (2020). Probiotic supplementation and its effect on cholesterol levels in hypercholesterolemic rats. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103661.
- Naveena, B., & Nagaraju, M. (2020). Microencapsulation techniques and its application in food industry. *International Journal of Chemical Studies*, *8*(1), 2560-2563.
- Nayak, C., Ramachandra, C. T., & Kumar, G. (2020). A Comprehensive Review on Composition of Donkey Milk in Comparison to Human, Cow, Buffalo,

Sheep, Goat, Camel and Horse Milk. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 54(3).

Niamah Alaa Kareem, Thyab Gddoa Shayma Al-Sahlany and Al-Manhel Alaa Jabbar(2016). Gum Arabic Uses as Prebiotic in Yogurt Production and Study Effects on Physical, Chemical Properties and Survivability of Probiotic Bacteria During Cold Storage. *World Applied Sciences Journal* 34 (9): 1190-1196

Niamah, A. K., Al-Fekaiki, D. F., Thyab Gddoa Al-Sahlany, S., Verma, D. K., Patel, A. R., & Singh, S. (2023). Investigating the effect of addition of probiotic microorganisms (bacteria or yeast) to yoghurt on the viability and volatile aromatic profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(5), 5463-5473.

Niamah, A. K., Al-Manhel, A. J., & Al-Sahlany, S. T. G. (2018). Effect microencapsulation of *Saccharomyces boulardii* on viability of yeast invitro and ice cream. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 10(3), 100-107.

Niamah, A. K., Al-Sahlany, S. T. G., Ibrahim, S. A., Verma, D. K., Thakur, M., Singh, S., ... & Utama, G. L. (2021). Electro-hydrodynamic processing for encapsulation of probiotics: A review on recent trends, technological development, challenges and future prospect. *Food Bioscience*, 44, 101458.

Niamah, A. K., Mohammed, A. A., & Alhelf, N. A. (2023). Antibacterial activity and identification of produced reuterin from local *Lactobacillus reuteri* LBIQ1 isolate. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 12(5), e4701-e4701.

Nielsen, S. S. (2010). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food analysis laboratory manual*, 47-53.

Nishanthi, M.; Chandrapala, J. & Vasiljevic, T. (2017). Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. *Int. Dairy.J.*,74:49-56.

O

Obazelu, P. A., Aruomaren, I. A., & Nwangwu, C. C. (2021). Effects of probiotic *Saccharomyces boulardii* and co-trimoxazole on some haematological parameters in adult Wistar rats. *African Journal of Health, Safety and Environment*, 2(2), 55-62.

Ohshima, T., Kojima, Y., Seneviratne, C. J., & Maeda, N. (2016). Therapeutic application of synbiotics, a fusion of probiotics and prebiotics, and biogenics as a new concept for oral *Candida* infections: a mini review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 10.

Ozdemir, N., Bayrak, A., Tat, T., Altay, F., Kiralan, M., & Kurt, A. (2021). Microencapsulation of basil essential oil: Utilization of gum arabic/whey protein isolate/maltodextrin combinations for encapsulation efficiency and in vitro release. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 1865-1876.

P

Paineau, D., Carcano, D., Leyer, G., Darquy, S., Alyanakian, M. A., Simoneau, G., ... & Ouwehand, A. C. (2008). Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized,

controlled trial. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(1), 107-113.

- Palaniyandi, S. S., Yang, S. H., & Kwon, J. H. (2019).** Probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus*: Effects on cholesterol metabolism in hypercholesterolemic rats. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 1856-1867.
- Pandey, P., Mettu, S., Mishra, H. N., Ashokkumar, M., & Martin, G. J. (2021).** Multilayer co-encapsulation of probiotics and γ -amino butyric acid (GABA) using ultrasound for functional food applications. *Lwt*, 146, 111432.
- Pedroso D.L, Thomazini, M., Barrozo Heinemann, R. J., and Favaro-Trindade, C.S. (2012).** Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, 26,127-132.
- Pereira, J. O., Soares, J., Monteiro, M. J., Gomes, A., & Pintado, M. (2018).** Impact of whey protein coating incorporated with Bifidobacterium and Lactobacillus on sliced ham properties. *Meat science*, 139, 125-133.
- Perrin, D. (2012).** *Buffers for pH and metal ion control*. Springer Science & Business Media.
- Phùng, D., H. Vu, A. Rodklongtan and P. Chitprasert (2021).** Whey protein isolate-lignin complexes as encapsulating agents for enhanced survival during spray drying, storage, and in vitro gastrointestinal passage of *Lactobacillus reuteri* KUBAC5. *LWT-Food Science and Technology*, V(148): 111725.
- Picot, A., and Lacroix, C. (2003).** Production of multiphase water-insoluble microcapsules for cell microencapsulation using an emulsification/spray-drying technology. *Journal of Food Science*, 68, 2693- 2700

- Popović, N., Brdarić, E., Đokić, J., Dinić, M., Veljović, K., Golić, N., & Terzić-Vidojević, A. (2020). Yogurt produced by novel natural starter cultures improves gut epithelial barrier in vitro. *Microorganisms*, 8(10), 1–18.
- Poupon, R. (2015). Liver alkaline phosphatase: a missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology*, 61(6), 2080-2090.
- Puttarat, N., Thangrongthong, S., Kasemwong, K., Kerdsup, P., & Taweechoitipatr, M. (2021). Spray-drying microencapsulation using whey protein isolate and nano-crystalline starch for enhancing the survivability and stability of *Lactobacillus reuteri* TF-7. *Food Science and Biotechnology*, 30, 245-256.

R

- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* by spray drying in combination with sugars and sugar derivatives. *Food Bioscience*, 12, 96-104.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food chemistry*, 135(3), 1411-1418.
- Raqad R. Al-Hatim*, Ali K. Al-Rikabi and Amal K. Ghadban (2020). The Physico-Chemical Properties of Bovine and Buffalo Whey Proteins Milk by Using Ultrafiltration Membrane Technology. *Basrah J. Agric. Sci.*, 33(1): 122-134.
- Ren, D., Wang, D., Rong, F., Liu, H., Shen, M., and Yu, H. (2019). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* attenuates inflammatory damage in mice challenged with two pathogens. *European Journal of Inflammation*, 17, 2058739219833542.

- Revers, L. M., Danielli, A. J., Iltchenco, S., Zeni, J., Steffens, C., & Steffens, J. (2016). Obtenção e caracterização de iogurtes elaborados com leites de ovelha e de vaca. *Revista Ceres*, 63, 747-753.
- Reynolds, R. (1989). Tetracycline stability in solution. *Journal of Pharmaceutical sciences*.
- Rodklongtan, A., & Chitprasert, P. (2017). Combined effects of holy basil essential oil and inlet temperature on lipid peroxidation and survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during spray drying. *Food research international*, 100, 276-283.
- Rodklongtan, A., La-Ongkham, O., Nitisinprasert, S., & Chitprasert, P. (2014). Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate-chitosan semi-interpenetrating polymer networks. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 227–238.
- Rodrigues D., Sousa S., Rocha-Santos T., Silva J. P., Lobo S. J.M., Costa P., Amaral M.H., Pintado M.M., Gomes A.M., Malcata F.X., Freitas A.C. (2011). Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21(11), 869–876.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review. *Food research international*, 137, 109682.

- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Pereira, G. A., Bicas, J. L., and Sato, H. H. (2022). Effective encapsulation of reuterin-producing *Limosilactobacillus reuteri* in alginate beads prepared with different mucilages/gums. *Biotechnology Reports*, 34, e00737.
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251-258.
- Rosolen, M. D., Bordini, F. W., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, Â. M., ... & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *Lwt*, 115, 108411.
- Ross, R., Desmond, C., Fitzgerald, G., and Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410-1417.
- Ryan, C., et al. (2015). A study on the effects of probiotics on lipid levels in humans. *Clinical Trials in Gastroenterology*, 18(3), 112-118.

S

- Saadi, S., Makhoul, C., Nacer, N. E., Halima, B., Faiza, A., Kahina, H., ... & Saoudi, Z. (2024). Whey proteins as multifunctional food materials: Recent advancements in hydrolysis, separation, and peptidomimetic approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1), e13288.

- Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Rahman, M. R. T., & Van Vuong, Q. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 230-251.
- Sakai, Y., Nasti, A., Takeshita, Y., Okumura, M., Kitajima, S., Honda, M., ... & Kaneko, S. (2021). Eight-year longitudinal study of whole blood gene expression profiles in individuals undergoing long-term medical follow-up. *Scientific Reports*, 11(1), 16564.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.
- Santivarangkna, C. S., Kulozik, U., & Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of *lactic acid* starter cultures. 302-315.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2006). Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Letters in Applied Microbiology*, 42(3), 271-276.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of applied microbiology*, 105(1), 1-13.
- Santivarangkna, C., Naumann, D., Kulozik, U., & Foerst, P. (2010). Protective effects of sorbitol during the vacuum drying of *Lactobacillus helveticus*: an FT-IR study. *Annals of microbiology*, 60, 235-242.
- Schell, D., & Beermann, C. (2014). Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food Research International*, 62, 308-314.

- Seo, B. J., Mun, M. R., Kim, C. J., Lee, I., Chang, Y. H., & Park, Y. H. (2010). Bile tolerant *Lactobacillus reuteri* isolated from pig feces inhibits enteric bacterial pathogens and porcine rotavirus. *Veterinary research communications*, *34*, 323-333.
- Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S. M. A., & Kashiri, M. (2020). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *Lwt*, *118*, 108758.
- Sharifi, S., Rezazad-Bari, M., Alizadeh, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2021). Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* and phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese. *Food Hydrocolloids*, *113*, 106496.
- Sharma, R., Rashidinejad, A., & Jafari, S. M. (2022). Application of spray dried encapsulated probiotics in functional food formulations. *Food and Bioprocess Technology*, *15*(10), 2135-2154.
- Shigematsu, E., Dorta, C., Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Giannoni, J. A., Oshiiwa, M., & Mauro, M. A. (2018). Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. *Journal of food science and technology*, *55*, 3712-3720.
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences*, *24*(1), 1-5.
- Shori, A.B., A.S. Baba, M. Misran and H.W. Tan,(2014). Influence of *Allium sativum* or *Cinnamomum verum* on physicochemical characteristics of yogurt. *International Journal of Dairy Science*, *9*(2): 45-55.

- Shwethnisha and Nongmaithem Mangalleima, R. S. M. N. (2021). The Product and the Manufacturing of Yoghurt. *International Journal for Modern Trends in Science and Technology*, 7(10), 48–51
- Siddiqui, S. A., Salman, S. H. M., Redha, A. A., Zannou, O., Chabi, I. B., Oussou, K. F., ... & Maqsood, S. (2024). Physicochemical and nutritional properties of different non-bovine milk and dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 148, 105790.
- Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M., & Viridi, J. S. (2019). Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. *Frontiers in microbiology*, 10, 1567.
- Singh, S. C., & Kumar, S. (2016). Probiotics in critically ill children. *F1000Research*, 5.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International dairy journal*, 18(7), 695-704.
- Smyth, H. D., & Barrett, M. (1980). Application of eosin stain in tissue analysis. *Journal of Histotechnology*, 13(4), 253-259.
- Soltani Lak, A., Marhamatizadeh, M. H., & Fattahi, H. (2021). Stability of encapsulated *Lactobacillus reuteri* during harsh conditions, storage period, and simulated in vitro conditions. *Journal of Food Quality*, 2021(1), 3872190.
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1255-1268.

Speak, M. (1984). Compendium of method for the microbiological examination for food. *American Public Health Association, Washington.*

Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., & StanicVucinic, D. (2013). Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1263–1271.

SUN C., JIANG F., GAO W., LI X., YU Y., YIN X., WANG Y., DING H. (2017). Scanning electron microscopy coupled with energydispersive X-ray spectrometry for quick detection of sulfuroxidizing bacteria in environmental water samples. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. V(35),185–191.

T

Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 37(1), 5-20.

Terzioğlu, M., and Bakırcı, İ. (2023). Comparison of buffalo's, sheep's and goat's yoghurts in terms of their antioxidant activity, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, volatile compound content and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) content. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 79(3).

- Thakkar, P. N., Patel, A., Modi, H. A., & Prajapati, J. B. (2020).** Hypocholesterolemic effect of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* strains isolated from traditional fermented foods in wistar rats. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3), 1002-1011.
- Thomas, C. M., Hong, T., van Pijkeren, J. P., Hemarajata, P., Trinh, D. V., Hu, W., et al. (2012).** Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One* 7:e31951.
- Thomas, C. M., Saulnier, D. M., Spinler, J. K., Hemarajata, P., Gao, C., Jones, S. E., ... & Versalovic, J. (2016).** FolC₂-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Microbiologyopen*, 5(5), 802-818.
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016).** Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of biotechnology*, 239, 23-33.
- Trindade C. F. and Grosso C. (2000).** effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft*, 55, 496–499.
- Tymczyszyn, E. E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2008).** Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 342-347.

U

- Ünal, E., & Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *Gıda*, 35(4), 297-304.
- Uni, Z.; S. Ganot and Sklan, D. (1998). Post hatch development of mucosal function in the broiler small intestines. *Poult. Sci.*,77:72-75.
- Urbańska, M., & Szajewska, H. (2014). The efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. *European journal of pediatrics*, 173, 1327-1337.

V

- Vakilpour, A., Amini-Salehi, E., Soltani Moghadam, A., Keivanlou, M. H., Letafatkar, N., Habibi, A., ... & Samethadka Nayak, S. (2024). The effects of gut microbiome manipulation on glycemic indices in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a comprehensive umbrella review. *Nutrition & Diabetes*, 14(1), 25.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., & Ladefoged, K. (2004). Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1176-1181.
- Verma, D. K., Al-Sahlany, S. T. G., Niamah, A. K., Thakur, M., Shah, N., Singh, S., ... & Aguilar, C. N. (2022). Recent trends in microbial flavour Compounds: A review on Chemistry, synthesis mechanism and their application in food. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1565-1576.

- Verma, M., & Rout, P. K. (2022). Probiotics: promising opportunity for future functional foods. *In Recent Advances in Food Biotechnology* (pp. 75-96). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in food and its role in maintaining probiotic viability. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 33-35.
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52, 6112-6124.
- Vital, A. C. P., Goto, P. A., Hanai, L. N., Gomes-da-Costa, S. M., de Abreu Filho, B. A., Nakamura, C. V., & Matumoto-Pintro, P. T. (2015). Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1028-1035.
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., ... & Gowda, N. N. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3(1), 100248.
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., & Saif, L. J. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 172, 72-84.

Vũ, P. D. H., Rodklongtan, A., and Chitprasert, P. (2021). Whey protein isolate-lignin complexes as encapsulating agents for enhanced survival during spray drying, storage, and in vitro gastrointestinal passage of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Lwt*, *148*, 111725.

W

Walter, J., Britton, R. A., & Roos, S. (2011). Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(supplement_1), 4645-4652.

Wang, A. N., Yi, X. W., Yu, H. F., Dong, B., & Qiao, S. Y. (2009). Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1140-1148.

Wang, A., & Zhong, Q. (2024). Drying of probiotics to enhance the viability during preparation, storage, food application, and digestion: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *23*(1), e13287.

Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., & Li, J. (2008). Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Current microbiology*, *57*, 33-38.

Wang, C., Zhang, C., Li, S., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., ... & Zhai, Q. (2020). Effects of probiotic supplementation on dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Foods*, *9*(11), 1540.

- Wang, F., & Mutukumira, A. N. (2022). Microencapsulation of *Limosilactobacillus reuteri* DPC16 by spray drying using different encapsulation wall materials. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10), e16880.
- Wang, F., Shi, H., Wang, S., Wang, Y., Cao, Z., and Li, S. (2019). Amino acid metabolism in dairy cows and their regulation in milk synthesis. *Current drug metabolism*, 20 (1), 36-45.
- Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., & Bao, Q. (2012). Selection of potential probiotic *lactobacilli* for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *Journal of dairy science*, 95(4), 1645-1654.
- Wang, L., Guo, M. J., Gao, Q., Yang, J. F., Yang, L., Pang, X. L., & Jiang, X. J. (2018). The effects of probiotics on total cholesterol: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 97(5), e9679.
- Wang, S., Naumovski, N., Ajlouni, S., Ayyash, M., Silva, R., Balthazar, C. F., ... & Ranadheera, C. S. (2023). Nonbovine milk and its products as sources of probiotics delivery: An overview of its viability, functionality and product quality characteristics. *International Journal of Dairy Technology*, 76(3), 482-511.
- Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, A., Nicholson-Weller, A., & Lee, J. C. (2005). *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunity*, 73(6), 3502-3511.
- Widyastuti, Y., & Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.

Wong, C. C., & Yu, J. (2023). Gut microbiota in colorectal cancer development and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 20(7), 429-452.

X

Xie, L. W., Lu, H. Y., Tang, L. F., Tang, F. L., Zhu, R. Q., Wang, D. F., ... and Li, M. (2024). Probiotic consortia protect the intestine against radiation injury by improving intestinal epithelial homeostasis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol. 120, No. 1, pp. 189-204.

Y

Yadav, S., & Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of animal science and biotechnology*, 10, 1-11.

Yang, M., Liang, Z., Wang, L., Qi, M., Luo, Z., & Li, L. (2020). Microencapsulation delivery system in food industry—Challenge and the way forward. *Advances in polymer technology*, 2020(1), 7531810.

Ye Q, Woo MW, Selomulya C. (2019). Modification of molecular conformation of spray-dried whey protein microparticles improving digestibility and release characteristics. *Food Chem.* 280: 255-261.

Ye, Q., Georges, N., & Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167-179.

- Yıkmış, S., Aksu, H., Alpaslan, M., & Şimşek, O. (2018). Probiotic microorganisms and encapsulation method approaches. In *Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology* (pp. 132-151). Igi Global.
- Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of functional foods*, 5(1), 98-105.
- Ying, D., Sun, J., Sanguansri, L., Weerakkody, R., & Augustin, M. A. (2012). Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 597-602.
- Yu, B., Liu, J. R., Chiou, M. Y., Hsu, Y. R., & Chiou, P. W. S. (2007). The effects of probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 20(8), 1243-1251.

Z

- Zam, W. (2020). Microencapsulation: A prospective to protect probiotics. *Current Nutrition & Food Science*, 16(6), 891-899.
- Zanjani, M. A. K., Ehsani, M. R., Ghiassi Tarzi, B., & Sharifan, A. (2018). Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* survival by microencapsulation with different starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13318.

- Zhao, C., Chen, N., & Ashaolu, T. J. (2022). Whey proteins and peptides in health-promoting functions—A review. *International Dairy Journal*, *126*, 105269.
- Zhao, F., Feng, J., Li, J., Zhao, L., & Liu, Y. (2021). Probiotics and modulation of gut microbiota: Potential for treating cardiovascular diseases. *Nutrients*, *13*(5), 1553.
- Zimmermann, J. A., Sirini, N., Olivero, C. R., Renna, M. S., Signorini, M. L., Zbrun, M. V., ... & Soto, L. P. (2024). Macroencapsulation of *Limosilactobacillus reuteri* DSPV002C as nutritional supplement for piglets: Storage stability and survival in gastrointestinal conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, *56*(1), 90-101.
- Zou Q, Liu X, Zhao J, Tian F, Zhang HP, Zhang H, Chen W.(2012). Microencapsulation of Bifidobacterium bifidum F-35 in whey protein-based microcapsules by transglutaminase-induced gelation. *J. Food Sci.* *77*: 270-277.
- Zouari, A., Briard-Bion, V., Schuck, P., Gaucheron, F., Delaplace, G., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2020). Changes in physical and biochemical properties of spray dried camel and bovine milk powders. *LWT*, *128*, 109437.

UNIANOVA bacteria BY storage temperature spss التحليل الاحصائي باستخدام برنامج

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: bactria					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.448 ^a	11	.041	444.769	.000
Intercept	3352.989	1	3352.989	36578062.091	.000
Storage	.368	5	.074	802.091	.000
Temperature	.060	1	.060	654.818	.000
storage * temperature	.021	5	.004	45.436	.000
Error	.002	24	9.167E-005		
Total	3353.440	36			
Corrected Total	.451	35			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

UNIANOVA efficiency BY storage temperature

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: efficiency					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	46.066 ^a	11	4.188	44617.037	.000
Intercept	342854.554	1	342854.554	3652786017.618	.000
Storage	37.685	5	7.537	80299.760	.000
Temperature	6.361	1	6.361	67773.806	.000
storage * temperature	2.019	5	.404	4302.961	.000
Error	.002	24	9.386E-005		
Total	342900.622	36			
Corrected Total	46.068	35			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

التحليل الاحصائي باستخدام برنامج genstat12
 Statistical analysis using genstat12. Table (3)
 Logarithm of bacterial counts (CFU/g)

C1	Storage				
C2	Temperature				
Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	5	0.211883	0.042377	25.17	<.001
C2	1	0.050417	0.050417	29.95	<.001
C1.C2	5	0.012683	0.002537	1.51	0.259
Residual	12	0.020200	0.001683		
Total	23	0.295183			

storage	1	2	3	4	5	6
	9.7900	9.6800	9.5950	9.5950	9.5600	9.4950
temperature	1	2				
	9.6650	9.5733				

*** Least significant differences of means (5% level) ***			
Table	C1	C2	C1C2
l.s.d.	0.06321	0.03649	0.08939
cv%	0.4		

Microencapsulation Process Efficiency Percentage (%)

***** the percentage of efficiency of the microencapsulation process *****					
C1	Storage				
C2	Temperature				
Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	5	35.98933	7.19787	431.87	<.001
C2	1	3.46560	3.46560	207.94	<.001
C1.C2	5	1.85740	0.37148	22.29	<.001
Residual	12	0.20000	0.01667		
Total	23	41.51233			

C1	1	2	3	4	5	6
	99.085	98.020	97.110	96.755	96.100	95.340
C2	1	2				
	97.448	96.688				

Table	C1	C2	C1C2
l.s.d.	0.1989	0.1148	0.2813
cv%	0.1		

التحليل الاحصائي باستعمال برنامج spss

UNIANOVA Acidity BY A storge

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Acidity					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.776 ^a	15	.052	292.078	.000
Intercept	50.903	1	50.903	287449.988	.000
A	.261	3	.087	490.835	.000
Storge	.470	3	.157	884.278	.000
A * storge	.045	9	.005	28.425	.000
Error	.006	32	.000		
Total	51.684	48			
Corrected Total	.781	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

UNIANOVA PH BY A storge

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: PH					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.184 ^a	15	.012	108.914	.000
Intercept	974.341	1	974.341	8660812.519	.000
A	.048	3	.016	142.444	.000
Storge	.132	3	.044	390.642	.000
A * storge	.004	9	.000	3.827	.002
Error	.004	32	.000		
Total	974.529	48			
Corrected Total	.187	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

UNIANOVA WHC BY A storge

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: WHC					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2523.255 ^a	15	168.217	1682170.087	.000
Intercept	100634.515	1	100634.515	1006345147.687	.000
A	2154.335	3	718.112	7181116.187	.000
Storge	290.209	3	96.736	967364.187	.000
A * storge	78.711	9	8.746	87456.687	.000
Error	.003	32	.000		
Total	103157.773	48			
Corrected Total	2523.258	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

UNIANOVA STS BY A storage Acidity

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: STS					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1762.293 ^a	15	117.486	1122479.534	.000
Intercept	227235.668	1	227235.668	2171041416.180	.000
A	1375.422	3	458.474	4380325.946	.000
Storage	302.303	3	100.768	962748.876	.000
A * storage	84.567	9	9.396	89774.282	.000
Error	.003	32	.000		
Total	228997.964	48			
Corrected Total	1762.296	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

UNIANOVA LACTIC BY A storage

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: LACTIC					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25.134 ^a	15	1.676	13.394	.000
Intercept	3549.220	1	3549.220	28370.119	.000
A	14.758	3	4.919	39.322	.000
Storage	6.168	3	2.056	16.435	.000
A * storage	4.208	9	.468	3.737	.003
Error	4.003	32	.125		
Total	3578.358	48			
Corrected Total	29.137	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

UNIANOVA reuteri BY A storage

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: reuteri					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	554.314 ^a	15	36.954	72.004	.000
Intercept	1616.809	1	1616.809	3150.292	.000
A	546.476	3	182.159	354.929	.000
Storage	2.379	3	.793	1.545	.222
A * storage	5.459	9	.607	1.182	.339
Error	16.423	32	.513		
Total	2187.545	48			
Corrected Total	570.737	47			

*. The mean difference is significant at the .05 level.

***** Analysis of variance ***** storge

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	0.00	0.00	0.00	1.000
Residual	44	2697.00	61.30		
Total	47	2697.00			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 6.44

***** Analysis of variance ***** Acidity

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	0.26076	0.08692	7.34	<.001
Residual	44	0.52074	0.01184		
Total	47	0.78150			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 0.0895

***** Analysis of variance ***** pH

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	0.048075	0.016025	5.06	0.004
Residual	44	0.139317	0.003166		
Total	47	0.187392			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 0.04630

***** Analysis of variance ***** WHC%

Variate: C5

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	2154.335	718.112	85.65	<.001
Residual	44	368.923	8.385		
Total	47	2523.258			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 2.382

***** Analysis of variance ***** STS%

Variate: C6

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	1375.422	458.474	52.14	<.001
Residual	44	386.874	8.793		
Total	47	1762.296			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 2.440

***** Analysis of variance ***** storge

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	2.25	0.75	0.01	0.998
Residual	44	2613.00	59.39		
Total	47	2615.25			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 6.34

***** Analysis of variance ***** Total lactic acid bacteria

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	14.7579	4.9193	15.05	<.001
Residual	44	14.3795	0.3268		
Total	47	29.1374			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 0.4704

***** Analysis of variance ***** *L.reuteri*

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	546.4760	182.1587	330.37	<.001
Residual	44	24.2607	0.5514		
Total	47	570.7367			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 12
 d.f. 44
 l.s.d. 0.611

***** Stratum standard errors and coefficients of variation *****

Variate: C4

d.f. s.e. cv%
 44 0.743 12.8

.....

***** Analysis of variance ***** الكليتين **Kidneys**

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	1.6964	0.5655	3.82	0.057
Residual	8	1.1830	0.1479		
Total	11	2.8794			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table	C1
rep.	3
d.f.	8
l.s.d.	0.724

***** Analysis of variance ***** الكبد **Liver**

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	30.929	10.310	2.20	0.166
Residual	8	37.559	4.695		
Total	11	68.488			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table	C1
rep.	3
d.f.	8
l.s.d.	4.080

***** Analysis of variance ***** متوسط اوزان الجسم للحيوانات المختبرية لكل 200 غم من العليقة/ يوم *****

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	1584.89	528.30	5.72	0.005
Residual	20	1848.17	92.41		
Total	23	3433.06			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 6
 d.f. 20
 l.s.d. 11.58

***** Analysis of variance *****.

زيادة الوزن الاسبوعية

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	19	18876.23	993.49	19.09	<.001
Residual	40	2082.16	52.05		
Total	59	20958.39			

***** Tables of means *****

Variate: C3

Grand mean 26.05							
C1	1	2	3	4	5	6	7
	30.35	9.67	35.33	35.33	10.02	26.95	7.83
C1	8	9	10	11	12	13	14
	3.47	31.59	35.53	35.52	15.45	15.45	15.45
C1	15	16	17	18	19	20	
	79.92	23.74	23.74	14.08	14.08	57.47	

l.s.d. 11.906

***** Analysis of variance ***** فحوصات الدم Wbc

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	63078.	21026.	1.07	0.377
Residual	32	630572.	19705.		
Total	35	693650.			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 9
 d.f. 32
 l.s.d. 134.8

***** Analysis of variance ***** (Rbc)

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	57.039	19.013	5.81	0.003
Residual	32	104.680	3.271		
Total	35	161.720			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table	C1
rep.	9
d.f.	32
l.s.d.	1.737

***** Analysis of variance ***** (HGB)

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	9.831	3.277	0.85	0.476
Residual	32	122.993	3.844		
Total	35	132.823			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table	C1
rep.	9
d.f.	32
l.s.d.	1.883

***** Analysis of variance ***** **Cholesterol**

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	3.804E+02	1.268E+02	1.506E+06	<.001
Residual	8	6.733E-04	8.417E-05		
Total	11	3.804E+02			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table	C1
rep.	3
d.f.	8
l.s.d.	0.01727

***** Analysis of variance ***** **LDL**

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	55.9252749	18.6417583	1.052E+05	<.001
Residual	8	0.0014180	0.0001772		
Total	11	55.9266929			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.02507

***** Analysis of variance ***** **HDL**

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	4.788E+02	1.596E+02	4.593E+06	<.001
Residual	8	2.780E-04	3.475E-05		
Total	11	4.788E+02			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.01110

***** Analysis of variance ***** **VLDL**

Variate: C5

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	1.076E+02	3.586E+01	3.742E+06	<.001
Residual	8	7.667E-05	9.583E-06		
Total	11	1.076E+02			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.005829

***** Analysis of variance ***** **Trig**

Variate: C6

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	2.704E+03	9.014E+02	7.197E+06	<.001
Residual	8	1.002E-03	1.252E-04		
Total	11	2.704E+03			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.02107

***** Analysis of variance ***** ALT

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	5.338E+03	1.779E+03	6.562E+05	<.001
Residual	8	2.169E-02	2.712E-03		
Total	11	5.338E+03			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.0980

***** Analysis of variance ***** AST

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	4.842E+02	1.614E+02	9.650E+05	<.001
Residual	8	1.338E-03	1.673E-04		
Total	11	4.842E+02			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 8
 l.s.d. 0.02435

***** Analysis of variance ***** التقطيع النسيجي (طول الزغابات وعمق الخبايا)

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	3	577514.	192505.	18.36	<.001
Residual	32	335588.	10487.		
Total	35	913102.			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 9
 d.f. 32
 l.s.d. 98.3

اعداد بكتريا *L.reuteri* المغلفة خلال مرحلة الهضم المحضرة في المختبر. Cfu/g ,

**** Analysis of variance **** مرحلة الفم A

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	28842.667	28842.667	3762.09	<.001
Residual	4	30.667	7.667		
Total	5	28873.333			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 6.28

**** Analysis of variance **** مرحلة المعدة B

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	53960.167	53960.167	23125.79	<.001
Residual	4	9.333	2.333		
Total	5	53969.500			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 3.463

**** Analysis of variance **** مرحلة الامعاء الاثني عشري C

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	5046.000	5046.000	1009.20	<.001
Residual	4	20.000	5.000		
Total	5	5066.000			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 5.069

اعداد بكتريا *L.reuteri* المغلفة ضد أملاح الصفراء المحضرة في المختبر (Cfu/g) تمثل اعداد بكتريا (A,B,C,D)

***** Analysis of variance ***** A

Variate: C2

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	54721.500	54721.500	23452.07	<.001
Residual	4	9.333	2.333		
Total	5	54730.833			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 3.463

***** Analysis of variance ***** B

Variate: C3

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	541.500	541.500	216.60	<.001
Residual	4	10.000	2.500		
Total	5	551.500			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 3.584

***** Analysis of variance ***** C

Variate: C4

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	27744.000	27744.000	8323.20	<.001
Residual	4	13.333	3.333		
Total	5	27757.333			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 4.139

***** Analysis of variance ***** D

Variate: C5

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	1	2604.1667	2604.1667	3906.25	<.001
Residual	4	2.6667	0.6667		
Total	5	2606.8333			

*** Least significant differences of means (5% level) ***

Table C1
 rep. 3
 d.f. 4
 l.s.d. 1.851



محلول التغليف بمواد الصمغ العربي وشرش حليب
الجاموس المجفف



vacuum oven جهاز التجفيف تحت الضغط (التفريغ)



العينة المغلفة لبكتريا *Limosil.reuteri* بعد التجفيف



عينة التغليف بعد تقدير الرطوبة



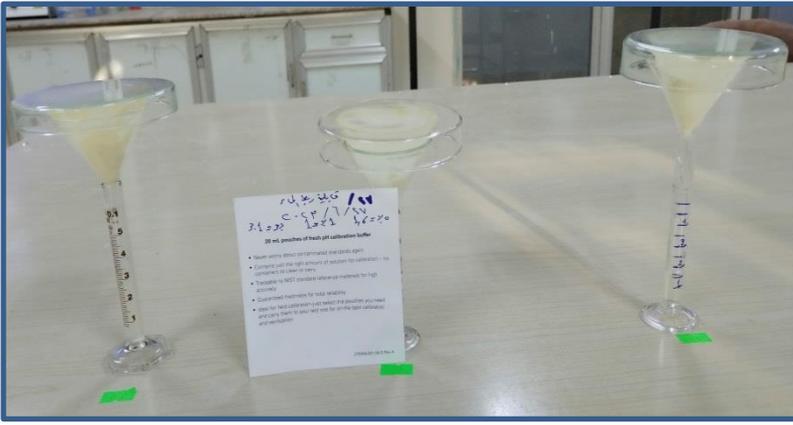
استعمال فرن التجفيف لتقدير الرطوبة النسبية



استعمال جهاز Colony Counter لعد مستعمرات البكتريا

ملحق (2-7) نماذج مصورة للعمل - مراحل

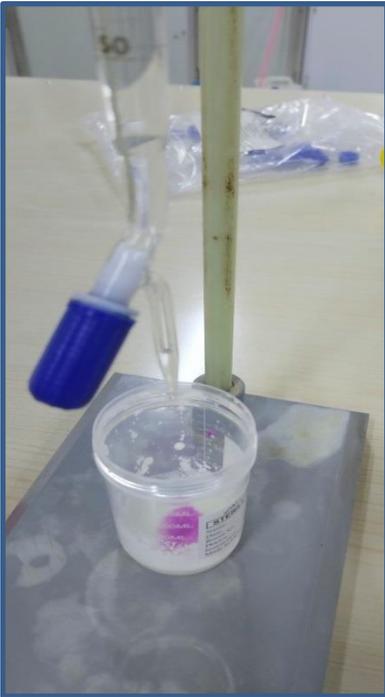
تجفيف العينة وإجراء اختباراتها



تقدير قابلية ربط الماء % للبن الرائب



انتاج اللبن الرائب المدعم بالبكتريا المغلفة



تقدير الحموضة الكلية % للبن الرائب



تقدير نضوح الشرش % للبن الرائب



تقدير الاس الهيدروجيني للبن الرائب

ملحق (2-7) نماذج مصورة للعمل - فحوصات اللبن



سحب عينة الدم من حيوانات المختبر



وزن الكبد والكليتين



حفظ الامعاء لغرض الدراسة النسيجية لحيوانات المختبر



الامعاء والكبد والكليتين لحيوانات المختبر

ملحق (2-7) نماذج مصورة للعمل - التجربة

8-Summary

Microencapsulation processes are used to maintain the viability of probiotics by combining active bacteria with proteins and sugars to protect the bacteria from external influences. The study included separating buffalo milk whey using the acid method drying it using a spray drying device and mixing it with gum Arabic in encapsulating *Limosilactobacillus reuteri* bacteria using a vacuum oven under a vacuum pressure of 600 ± 50 mbar and a temperature of $50\pm 5^\circ\text{C}$. After that, the properties of the coating were estimated using a scanning electron microscope (SEM-EDS) and the numbers of bacteria were calculated before and after drying the efficiency rate of the microencapsulation process and the amount of powder production. After that, the laboratory experiment was applied by testing the coating under the digestive system conditions and pH values (2.5, 3, 6 and 9) and a concentration of 0.1, 0.3 and 0.5% of bile salts. Finally, the coating resistance to temperatures (45 and 63) $^\circ\text{C}$ was studied.

Probiotic sheep yoghurt was produced by adding encapsulated bacteria at a concentration of 1 (T1) and 3 (T2) % and compared with free bacteria (unencapsulated T0) and control sample (Tc). Then laboratory rats were fed milk enriched with encapsulated bacteria and blood characteristics were studied for 60 days. The liver and kidneys were weighed and the intestines of the rat groups were histologically studied at the end of the experiment to determine the effect of encapsulation on resistance to digestive system conditions.

The results showed that the logarithm of bacterial numbers after the encapsulation process reached 9.12 CFU/g. At the same time, the efficiency of the encapsulation process was 77.68% with a moisture percentage of 4.26%, and the mass percentage of the resulting powder reached 83.58%. The external appearance

analysis images of the envelope surrounding the bacteria *Limosilactobacillus reuteri* using a scanning electron microscope (SEM-EDS) with an applied electron voltage of 15 kV and a magnification of 200 nm showed that the diameter of the envelope surrounding the bacteria was 68.29 nm. The storage period did not affect the number of bacteria and the encapsulation efficiency at 4°C and 25 °C for 6 months.

The encapsulated bacteria *Limosilactobacillus reuteri* were added to yoghurt made from sheep milk and fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. The results showed an improvement in the physicochemical, microbial and sensory properties of milk containing encapsulated therapeutic bacteria in treatment (T1, which contains encapsulated bacteria at a concentration of 1%, and treatment T2), which contains encapsulated bacteria at a concentration of 3%, compared to treatment Tc, which contains only starter bacteria, and treatment T0, which contains free, unencapsulated bacteria. The highest sensory evaluation was for treatment T2 during a storage period of 21 days at a temperature of 4°C.

The pH values ranged between 4.51-5.61 on the first day of storage, while the total acidity ranged between 0.84-0.98% and the water binding capacity (WHC) in sample Tc was 43.31% and increased in sample T2 to reach 58.40%. At the same time, the whey leaching rate decreased in samples T1 and T2 compared to samples Tc and T0 after 21 days of storage. The reduction rate in lactic acid bacteria was 20.50, 18.21, 1.86, and 1.72% for samples Tc, T0, T1, and T2 respectively, while the reduction rate in *Limosilactobacillus reuteri* bacteria reached 26.76, 1.00, 0.98% for samples T0, T1, T2 respectively.

A relative increase in the weight of laboratory rats was observed in the Tf, T1 and T3 treatments, where the average weight was (148, 117.83 and 139.76) gm, respectively, compared to Tc, which was 163 gm in the last week of the experiment.

A slight increase in the weights of the liver and kidneys was also observed, where the average weight of the kidneys and liver was 1.74 and 7.126 gm for the T1 treatment, while it was 1.677 and 7.022 gm for the T3 treatment, compared to 1.727 and 6.941 gm in Tc, respectively. The results showed that the rat's group in the T3 treatment was superior at a significance level of $P \leq 0.05$ in both white blood cells, red blood cells and haemoglobin, and the highest concentration reached (11.7×10^9 cells/ml and 7.56×10^{12} cells/ml and 13.6 g/dl) respectively, compared with Tc which reached (7.8×10^9 cells/ml and 5.93×10^{12} cells/ml and 11.9 g/dl after 60 days of dosing respectively.

A decrease in the blood sugar level of rats that were dosed with encapsulated bacteria was observed, reaching (0.286 and 0.228995) g/dl in the T1 and T3 treatments respectively, compared with (0.46185 and 0.428605 g/dl in Tc and Tf respectively).

The encapsulated bacteria also outperformed at a significance level of $0.05 P \leq$ in reducing total cholesterol, low-density cholesterol (LDL), low-density lipoprotein (VLDL), triglycerides and increasing the level of good cholesterol (HDL) in the blood serum of laboratory rats throughout the experimental period compared to Tc and Tf. The highest activity was 225.2 IU/L for AST enzyme and 66.34 IU/L for ALT enzyme in Tc, compared to 194.565, 180.45 and (168.8 IU/L for AST enzyme and 53.82, 51.505 and (50.5 IU/L for ALT enzyme in Tf treatment and T1 and T3 treatment respectively.

Also, T3 treatment was superior at a significance level of $P \leq 0.05$ in villus length and crypt depth, as villus length reached 1912.61 pixels (506.04 mm) and crypt depth reached 1218.61 pixels (322.42 mm) compared to Tc and Tf.