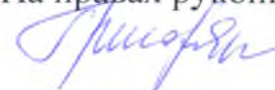


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ГРИГОРЯН РОЗА ЭМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР
ПРОБИОТИКОВ**

4.3.3 Пищевые системы

4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научные руководители:

доктор технических наук, доцент,
заведующий кафедрой прикладной
биотехнологии

Лодыгин Алексей Дмитриевич
доктор технических наук, доцент,
профессор кафедры прикладной
биотехнологии

Алиева Людмила Руслановна

Ставрополь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ВОПРОСА.....	12
1.1 Функциональные продукты питания	12
1.2 Микроинкапсуляция как метод сохранения функциональных свойств пробиотиков.....	22
1.3 Использование технологии микроинкапсулирования в производстве продуктов функционального питания.....	33
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	36
2.1 Организация работы и схема проведения исследований	36
2.2 Требования к объектам исследований и экспериментальным установкам.....	38
2.3 Методы экспериментальных исследований	40
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗМЕРА МИКРОКАПСУЛ НА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	49
3.1 Исследование морфологии гидратированных и сублимированных микрокапсул, полученных методом экструзии.....	49
3.2 Исследование влияния размера микрокапсул на жизнеспособность <i>Lpb. plantarum</i>	60
3.3 Изучение физико-химических свойств микрокапсул в зависимости от их размера.....	63
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>STR. THERMOPHILUS</i> И <i>LPB. PLANTARUM</i> В СВОБОДНОЙ И КАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЕ В МОЛОКЕ	90
4.1 Определение оптимальных условий роста <i>Str. thermophilus</i> для совместного культивирования с <i>Lpb. plantarum</i>	91
4.2 Изучение динамики совместного культивирования <i>Lpb. plantarum</i> в свободной форме и <i>Str. thermophilus</i> в молочной среде.....	96

4.3 Исследование динамики совместного культивирования <i>Lpb. plantarum</i> в капсулированной форме и <i>Str. thermophilus</i> в молочной среде.....	103
4.4 Исследование влияния совместной ферментации <i>Lpb. plantarum</i> в свободной и капсулированной формах и <i>Str. thermophilus</i> на качественные характеристики кисломолочного продукта при длительном хранении	109
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА BIOTEХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР ПРОБИОТИКОВ.....	117
5.1 Обоснование параметров технологического процесса производства кисломолочного продукта.....	117
5.2 Определение рисков и критических контрольных точек разработанной технологии.....	122
5.3 Оценка экономической эффективности производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков...	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133
ПРИЛОЖЕНИЯ	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние годы наблюдается устойчивый рост интереса к продуктам, предназначенным для целенаправленного улучшения здоровья человека, которые в научной литературе принято обозначать как функциональные продукты питания [1]. К категории таких продуктов относятся пищевые системы, обогащенные пробиотиками. Согласно современному определению, пробиотики представляют собой «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают благотворное влияние на здоровье организма-хозяина» [2]. Положительные свойства пробиотиков обусловлены их способностью влиять на различные функции макроорганизма. В частности, они участвуют в регуляции кишечного микробиоценоза, угнетая рост патогенов за счет конкурентного вытеснения и синтеза бактерицидных веществ [3]. Кроме того, пробиотики участвуют в поддержании иммунного гомеостаза хозяина, подавляя регуляцию воспалительных цитокинов, вызывая стимуляцию иммунных реакций и регуляцию экспрессии генов, ассоциированных с кишечником [4]. Профилактика ожирения и сопутствующих метаболических состояний также относится к числу важных функций пробиотиков, которая достигается благодаря модуляции процессов липидного, холестеринавого и углеводного обмена [5, 6]. Наконец, пробиотические микроорганизмы проявляют антиоксидантную активность, связывая активные формы кислорода (АФК), усиливают ферментативную и не ферментативную антиоксидантную активность и, таким образом, снижают перекисное окисление липидов [7].

В настоящее время одними из наиболее распространенных пробиотических продуктов на рынке являются ферментированные йогурты, сыры, мармелад и пищевые добавки.

Для сохранения функциональности пробиотических продуктов необходимо обеспечить не только достаточное содержание жизнеспособных пробиотических бактерий в продукте на момент употребления, но и их эффективную доставку в толстый кишечник. Исследования показывают, что минимальная концентрация жизнеспособных пробиотических клеток в продукте, необходимая для оказания положительного физиологического эффекта, должна составлять не менее 10^6 – 10^7 КОЕ/см³ [8]. Проблема сохранения жизнеспособности пробиотиков обусловлена их чувствительностью к технологическим параметрам производства (температура, кислород, низкая активность воды) и условиям среды желудочно-кишечного тракта (кислая реакция среды, протеолитические ферменты, желчные кислоты) [9; 10]. Указанные факторы снижают стабильность пробиотических культур как на этапах обработки и хранения пищевых систем, так и при их доставке в дистальные отделы кишечника.

Использование систем микроинкапсулирования позволяет защитить пробиотики от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды, обеспечивая тем самым их высокую выживаемость и способность к колонизации толстого кишечника [11]. Инкапсуляция пробиотиков требует разработки сложной системы в зависимости от вида микроорганизмов и целевого назначения продукта. Системы инкапсуляции пищевых продуктов, обычно используемые для производства пробиотиков, включают в себя: эмульсии, множественные эмульсии, эмульсионные гели, гидрогели, порошкообразные гранулы, нановолокна с электроспрядением, капсулы с электрораспылением и нанопокртия [12, 13, 14, 15]. Важным аспектом при разработке этих систем является обеспечение жизнеспособности инкапсулированных пробиотиков.

Жизнеспособность пробиотиков также можно повысить, сочетая их с другими веществами, такими как пребиотики или нутрицевтики. Например, совместное введение пробиотиков с пребиотиками, такими как фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, инулин может значительно повысить их жизнеспособность в пищевых продуктах и желудочно-кишечном тракте. Эти синбиотики оказывают более мощное воздействие на здоровье, чем

пробиотики или пребиотики, используемые отдельно, тем самым проявляя синергетический эффект [16, 17].

Для повышения эффективности пробиотиков и нутрибиотиков при колонизации толстой кишки применяются различные системы их совместной инкапсуляции [18]. Однако перечень успешных разработок в области микроинкапсуляции пробиотиков все еще довольно ограничен. Описанные в научной литературе системы не в состоянии полностью сохранить жизнеспособность всех пробиотиков, и непригодны для коммерческого применения в массовом промышленном производстве пищевых продуктов [19, 20].

Степень разработанности темы исследования. Теоретические и практические основы в области технологий функциональных пищевых ингредиентов и продуктов заложены в трудах отечественных и зарубежных ученых: Храмцова А.Г., Евдокимова И.А., Просекова А.Ю., Петрова А.Н., Галстян А.Г., Дунченко Н.И., Лодыгина А.Д., Рябцевой С.А., Хамагаевой И.С., Ганиной В.И., Гаврилова Г.Б., Тихомировой Н.А., Позняковского В.М., Курбановой М.Г., Гавриловой Н.Б. и др.

Значительный вклад в развитие методов микроинкапсулирования пищевых ингредиентов и пробиотиков внесли исследования Agudelo J., Champagne C.P., Desai K.G.H., Doherty S., Fang Z., Frakolaki G., Huq T., Mao L., McClements D.J., Poletto G., Rodrigues F.J., Vivek K., Wandrey C., Zuidam N.J. и др. Работы этих авторов охватывают широкий спектр вопросов, таких как выбор материалов-носителей, оптимизацию методов инкапсуляции, исследование стабильности инкапсулированных форм в различных условиях.

Однако данных о промышленном использовании микроинкапсулированных пробиотических микроорганизмов в процессе производства кисломолочных продуктов функционального назначения недостаточно.

Цель и задачи исследований. Целью диссертационной работы является разработка научно обоснованной биотехнологии кисломолочного продукта с

использованием микроинкапсулированных пробиотических культур микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели исследований были сформулированы следующие основные научные задачи:

- провести анализ современных способов микроинкапсулирования и обосновать выбор культур пробиотических микроорганизмов и материалов-носителей для микроинкапсулирования;

- установить оптимальные технологические параметры получения микрокапсул с *Lactiplantibacillus plantarum* методом экструзии;

- исследовать влияние размера микрокапсул в гидратированной и сублимированной формах на их физико-химические свойства (состав оболочки, внутренний объем, термостабильность);

- изучить влияние процесса микроинкапсулирования на жизнеспособность пробиотической культуры, метаболический профиль и синтез биологически активных веществ;

- исследовать закономерности совместного культивирования *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* и *Lactiplantibacillus plantarum* в свободной и капсулированной формах в молоке, определить оптимальное для продукта соотношение культур;

- провести сравнительную оценку влияния свободной и капсулированной форм *Lpb. plantarum* на качественные характеристики, сроки хранения и выживаемость пробиотика в кисломолочном продукте;

- разработать биотехнологию и рецептуру кисломолочного продукта с микроинкапсулированной культурой пробиотика, провести ее апробацию в промышленных условиях;

- оценить показатели качества и безопасности готового продукта, провести анализ рисков по системе ХАССП и рассчитать экономическую эффективность предложенной технологии.

Научная новизна. Экспериментально обоснованы технологические режимы экструзионного получения микрокапсул различного размера с

Lactiplantibacillus plantarum в оболочке из альгината кальция. Установлено, что уменьшение размера капсул сопровождается увеличением содержания кальция в оболочке, снижением доли альгината и, как следствие, повышением термостабильности, подтвержденным ростом энергии активации термодеструкции. Выявлены закономерности влияния размера микрокапсул на жизнеспособность *Lpb. plantarum*. Доказано, что процесс микроинкапсулирования вызывает адаптивные метаболические реакции у *Lpb. plantarum*, влияющие на синтез биологически активных веществ. Установлены закономерности совместной ферментации молока заквасочными культурами *Str. thermophilus* и *Lpb. plantarum* в микроинкапсулированной форме. Доказано, что использование капсулированной формы *Lpb. plantarum* позволяет увеличить срок годности кисломолочного продукта за счет замедления процессов постокисления, при сохранении высокой концентрации жизнеспособных клеток пробиотической культуры.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическую значимость представляют полученные сведения о свойствах и закономерностях развития пробиотика *Lpb. plantarum* в капсулированной форме, в т.ч. при совместной ферментации с заквасочными культурами молочнокислых микроорганизмов.

Разработан способ микроинкапсулирования пробиотических микроорганизмов, поданы 2 заявки на изобретение (Приложения А, Б). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе студентов по направлениям подготовки 19.03.01, 19.03.03, 19.04.01 факультета пищевой инженерии и биотехнологий имени академика А.Г. Храмцова Северо-Кавказского федерального университета (Приложение В).

Практическая значимость работы обусловлена выработкой экспериментальных партий микрокапсул различного размера из альгината натрия с *Lpb. plantarum* (Приложение Г). Разработана техническая документация на закваски в микроинкапсулированной форме (Приложение Д).

Разработаны рецептура и технология, утверждена техническая документация на производство кисломолочного продукта функционального назначения (ТУ 10.51.56.444-002-21986117-2025, Приложение Е). Проведена опытно-промышленная апробация разработанной технологии в производственных условиях АО «Молочный комбинат «Ставропольский» (Приложение Ж).

Методология и методы исследований. Диссертационные исследования базируются на основных принципах методологии научно-технической деятельности, в своей основе опираются на результаты известных разработок зарубежных и отечественных ученых в областях, связанных с тематикой выполненной работы.

При проведении исследований использовали общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований: физико-химические (газовая хроматография с масс-спектрометрией, термогравиметрический анализ, вискозиметрия, определение антиоксидантной активности), микробиологические, органолептические.

Для обработки экспериментальных данных применяли стандартные статистические методы: обработка данных с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), t-критерия Стьюдента ($P \leq 0,05$), корреляционного анализа Пирсона с использованием пакета Microsoft Office Excel 2016.

Основные положения, выносимые на защиту:

- научно обоснованные технологические параметры экструзионного микроинкапсулирования *Lactiplantibacillus plantarum*, обеспечивающие формирование защитной матрицы с регулируемым гранулометрическим составом, при котором достигается максимальная жизнеспособность пробиотических клеток в процессе хранения;

- закономерности совместного культивирования заквасочной культуры *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* с микроинкапсулированной формой *Lactiplantibacillus plantarum*, заключающиеся в пролонгированном воздействии мигрирующих через капсульную оболочку метаболитов иммобилизованных

клеток пробиотика на кинетику кислотообразования и реологические характеристики формируемого кисломолочного сгустка;

- биотехнология кисломолочного продукта функционального назначения, основанная на внесении микроинкапсулированной формы *Lpb. plantarum* на стадии сквашивания молока, что обеспечивает гарантированную жизнеспособность пробиотической культуры на протяжении всего срока хранения и ее целенаправленную доставку в кишечник человека.

Степень достоверности результатов подтверждается трехкратной повторностью экспериментов с применением стандартных и общепринятых методов исследований и статистической обработки полученных данных; использованием современных поверенных приборов и оборудования, имеющих установленный предел отклонений, проведением опытно-промышленных испытаний.

Апробация результатов. Основные положения работы обсуждены на научно-практических конференциях российского и международного уровня: Международной научно-практической конференции «Биотехнология: научные исследования и связь с производством» (г. Щелково, 2024 г.), VII Международной научно-технической конференции «Повышение качества жизни и обеспечение конкурентоспособности экономики на основе инновационных и научно-технических разработок» (г. Минск, 2024 г.), IX международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» и конференции «Инновационные биотехнологии природных и синтетических биологически активных веществ. Нарочанские чтения-16» (г. Ставрополь, 2024 г.), III Международной научно-практической конференции «Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (г. Барнаул, 2024 г.), Международной научно-практической конференции «Научно-практическое развитие АПК и производства продуктов здорового питания» (г. Омск, 2025 г.), XIV Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Минск, 2025 г.), X Международной научно-практической

конференции «Современные достижения биотехнологии: вектор на технологическое лидерство» (г. Ставрополь, 2025 г.). По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Работа выполнялась в соответствии с планом работ научного исследования в рамках реализации Мегагранта по Постановлению Правительства Российской Федерации № 220 «Изучение механизмов взаимодействия молочнокислых микроорганизмов, лактозосбраживающих дрожжей и биологически активных веществ при микроинкапсулировании различных фракций микробиоты», Соглашение № 075-15-2022-1129 от 01.07.2022 г. и стипендии Президента Российской Федерации для обучающихся за рубежом (Белорусский государственный университет, 2024 г., Приложение 3).

Структура и объем диссертации. Текст диссертации состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы из 210 источников и 10 приложений. Работа изложена на 159 страницах основного текста, включает 34 рисунка и 26 таблиц.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ВОПРОСА

1.1 Функциональные продукты питания

Забота о здоровье является одной из наиболее часто упоминаемых причин выбора пищевых продуктов в странах ЕС [21]. Принято считать, что люди самостоятельно несут ответственность за состояние своего здоровья. Болезни всё чаще рассматриваются как последствия поведения потребителя, а не как результат воздействия окружающей среды [22]. Питание может оказывать влияние на риск возникновения ожирения, рака, сердечно-сосудистых и других заболеваний, непосредственно связанных с образом жизни. В дополнение к общеизвестным полезным продуктам питание может включать отдельные компоненты, которые могут оказывать положительное действие на самочувствие.

Продукты, которые, оказывают особое полезное физиологическое воздействие на организм, обычно называются функциональными продуктами питания [23–26]. Определенный продукт питания можно сделать функциональным, увеличив количество или добавив в него потенциально полезные для здоровья компоненты. В качестве альтернативы можно снизить концентрацию вредных компонентов или заменить токсичные ингредиенты полезными. В США и Европе отсутствует официальное определение термина «функциональные пищевые продукты». Согласно утверждённым действиям ЕС, «продукт питания может считаться функциональным, если было доказано, что он благотворно влияет на одну или несколько основных функций организма, таким образом, что это либо улучшает состояние здоровья, либо приводит к снижению риска заболеваний». Функциональные пищевые продукты могут использоваться в качестве обычных пищевых продуктов [27]. Существует несколько способов

производства функциональных пищевых продуктов, различающихся по методу производства или назначению. Функциональные пищевые продукты, в том числе на молочной основе, могут быть модифицированы или обогащены различными веществами, а функциональность продукта может быть направлена на лечение определенного заболевания или на улучшение общего самочувствия [28].

При дефиците питательных веществ эффективным средством является обогащение пищевых продуктов различными ингредиентами. Термин «обогащение» используется как синоним термина «фортификация» (ФАО/ВОЗ, 1994) [29], но в других источниках он определяется как восстановление витаминов и минералов, утраченных в процессе переработки [30]. При этом необходимо учитывать совместимость носителя, обогащающего компонента и технологического процесса. Модифицированные продукты, в том числе обогащенные питательными веществами, также относятся к функциональным продуктам.

Различные молочные продукты функционального назначения завоевывают мировой рынок. Примерами являются пробиотические, пребиотические и симбиотические продукты, молоко с низким содержанием холестерина и омега-3, продукты с низким содержанием лактозы и безлактозные, а также молочные продукты, которые могут предупреждать гипертонию и влиять на иммунитет.

Кисломолочным продуктам и напиткам присущи различные питательные и лечебные свойства. Кисломолочные продукты, продаваемые как приносящие пользу для здоровья, должны соответствовать критериям рекомендуемого минимального количества жизнеспособных клеток, превышающего 10^6 КОЕ/см³ на момент их потребления. Противоопухолевая активность заквасочных микроорганизмов связана с их клеточной стенкой, поэтому она сохраняется даже после сушки. Кисломолочные продукты также обладают другими полезными свойствами: профилактика желудочно-кишечных инфекций, снижение уровня холестерина в сыворотке крови и антимуtagenная активность. Эти продукты рекомендуются к употреблению в пищу лицам с непереносимостью лактозы и пациентам, страдающим атеросклерозом. Разработка ферментированных

диетических препаратов и специализированных продуктов является развивающейся областью исследований.

1.1.1 Роль лактобактерий в производстве кисломолочных продуктов

Молочнокислые бактерии являются ключевым звеном в формировании пробиотических свойств и функциональной направленности кисломолочных продуктов, определяя их положительное влияние на физиологическое состояние и микроэкологию желудочно-кишечного тракта человека.

Молочнокислые бактерии на протяжении длительного времени находят широкое применение в пищевой биотехнологии в качестве заквасок при производстве ферментированных продуктов, в частности в молочной и мясной промышленности [31]. Ключевым метаболитом, образующимся в процессе молочнокислого брожения, является молочная кислота, представляющая собой коммерчески ценный продукт, востребованный в пищевой и фармацевтической отраслях. Существующие технологии её получения включают химический синтез и биотехнологические (ферментативные) способы. Однако ввиду растущего потребительского спроса на продукты натурального происхождения, молочная кислота, полученная путем микробиологического синтеза, занимает доминирующее положение на мировом рынке [32]. Производство кисломолочной продукции, включая сыры, творог, сметану и другие виды, занимает одно из ведущих мест в структуре пищевой индустрии, уступая по объему лишь сегменту алкогольных напитков, что обусловлено ее высокой коммерческой значимостью и стабильным потребительским спросом [33]. Исследованию кинетики молочнокислого брожения и влияния технологических факторов на активность заквасочной микрофлоры посвящено значительное количество работ. Широкое

распространение для моделирования данных процессов получил метод поверхности отклика (Response Surface Methodology, RSM), который успешно применяется для прогнозирования скорости кислотообразования и динамики роста популяций заквасочных культур. К числу ключевых факторов, определяющих эффективность ферментации, относятся температурный режим сквашивания, содержание жира и сухих веществ в молоке, а также доза внесения закваски. В случае производства йогурта особое значение приобретает соотношение кокков и палочек, которое оказывает регулирующее воздействие на органолептические и реологические свойства готового продукта. [34]. Для контроля процесса гелеобразования и оценки динамики накопления кислоты широко применяется потенциометрический метод измерения активной кислотности (рН) [35]. Одним из ключевых ограничений, характерных для молочнокислого брожения, является ингибирование метаболизма бактерий продуктами их жизнедеятельности. В связи с этим при разработке биотехнологических процессов большое значение приобретает математическое моделирование. Так, в работе Бунми и соавторов [36] представлена модель периодического и непрерывного культивирования штамма *Lactococcus lactis* NZ133. Исследование показало, что основными лимитирующими факторами для роста данной культуры являются снижение концентрации лактозы (субстратное голодание) и накопление лактата, что свидетельствует о высокой чувствительности используемого штамма к ингибированию продуктом.

Лактобактерии традиционно применяются в производстве кисломолочной продукции и играют ключевую роль в микробиологических процессах сквашивания и ферментации [37–40]. В процессе ферментации, по мере сбраживания лактозы и накопления молочной кислоты, происходит снижение рН молочной среды. Создающийся при этом кислый фон ингибирует развитие посторонней микрофлоры, создавая селективные преимущества для молочнокислых бактерий [41]. Рейд и др. [42] провели лабораторные исследования кисломолочных пищевых продуктов в Юго-Восточной Азии. Ими было успешно проведено определение генетических, биохимических и

физиологических основ ключевых технологических особенностей использования данных микроорганизмов [33]. Лактобактерии относятся к гетерогенным грамположительным микроорганизмам со строго ферментативным метаболизмом [43]. Одним из наиболее важных функциональных свойств, присущих всем лактобактериям, является их способность превращать лактозу и другие углеводы путём сбраживания в основной конечный продукт – молочную кислоту.

Способность лактобактерий трансформировать пищевое сырье, придавая продуктам новые свойства, а также проявлять антагонистическую активность в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры обусловила их широкое использование, как в домашнем, так и в промышленном производстве продуктов питания [44]. Молочнокислые микроорганизмы, используемые в производстве кисломолочных продуктов, подразделяются на ряд фенотипических и генотипических групп, каждая из которых отличается специфическими потребностями в питательных субстратах, а также уникальными метаболическими, культуральными и технологическими характеристиками. К числу наиболее значимых родов, представители которых встречаются в составе кисломолочных продуктов, относятся *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Lactococcus*. [45, 46]. Взаимодействие дрожжей и лактобактерий при производстве кисломолочных продуктов в Африке было изучено Нарвхусом и Гададжей в 2003 году [47]. У молочнокислых бактерий существует два основных способа ферментации; гомолактатный путь, при котором молочная кислота является основным конечным продуктом, и гетеролактатный путь, при котором в дополнение к молочной кислоте происходит образование других соединения, таких как уксусная кислота, диоксид углерода, этанол и т.д. [48]. Палочки и кокки по-разному сбраживают углеводы и конечные продукты составляют, по меньшей мере, 90 или 50% лактата для гомо- и гетероферментативных видов соответственно. Транспорт лактозы осуществляется через клеточную мембрану либо с помощью лактозопероксидазной системы, либо с помощью фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазной системы (Lac PEP-PTS). Последующие метаболические пути включают гликолитический путь

Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЕМР), фосфокетотазный путь для глюкозы, тагатозо-6-фосфатный путь для галактозо-6-фосфата и путь Лелуара для галактозы. Лактобактерии, содержащие альдолазу, то есть стрептококки, педиококки, облигатно гомоферментативные и факультативно гетероферментативные лактобактерии, осуществляют ферментацию субстрата с лактатом в качестве конечного продукта. Микроорганизмы, синтезирующие фосфокетотазу, можно разделить на две группы. Первые, лейконостоки и, как правило, гетероферментативные лактобактерии, следуют «6Р-глюконатному пути» с образованием эквимольных количеств CO_2 , лактата и ацетата. Вторые следуют «бифидос-пути» с образованием ацетата и лактата в молярном соотношении 3:2. Среди лактобактерий, метаболизм лактозы с точки зрения биохимического и генетического состава и его регуляции вероятно, лучше всего изучен у микроорганизмов рода *Lactococcus* [47].

1.1.2 Пробиотические микроорганизмы как основа функциональных продуктов питания

В современной научной литературе под пробиотиками принято понимать живые микробные культуры, которые при употреблении в достаточном количестве способны оказывать положительное влияние на физиологические функции и здоровье человека [49]. Микрофлора желудочно-кишечного тракта человека характеризуется высоким видовым разнообразием, как в раннем возрасте, так и у взрослых. В ходе многочисленных исследований идентифицировано значительное количество бактериальных таксонов, однако особое внимание уделяется пробиотическим микроорганизмам в связи с их потенциалом в коррекции микробиоценоза и укреплении здоровья.

Систематическое обобщение данных по данной проблематике представлено, в частности, в монографиях и тематических выпусках Всемирного информационного бюллетеня исследовательского центра Danone Vitapole (опубликовано 23 выпуска), где освещаются аспекты влияния кисломолочных продуктов на физиологическое состояние организма.

Как отмечалось ранее, в производстве кисломолочных продуктов и сыров широкое применение находят молочнокислые бактерии, дрожжи, плесневые грибы, а также их консорциумы. Детальная характеристика указанных микроорганизмов представлена в работах Тамиме (А. У. Tamime) и соавторов [50]. В отличие от традиционных заквасочных культур, пробиотические микроорганизмы должны сохранять жизнеспособность в условиях кислой среды желудка, при воздействии желчных солей, а также достигать толстого кишечника и проявлять способность к колонизации либо адгезии. Зарубежными и отечественными исследователями идентифицировано значительное число пробиотических штаммов, детально описаны их таксономическое положение и физиолого-биохимические свойства. Установлено, что данные виды преимущественно относятся к трем основным группам: *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei* (ранее *Lactobacillus casei*) и *Limosilactobacillus reuteri* - *Limosilactobacillus fermentum* (ранее *Lactobacillus reuteri* - *Lactobacillus fermentum*). При этом большинство штаммов, коммерчески используемых в производстве кисломолочных продуктов под наименованием *Lb. acidophilus*, по результатам генетической идентификации отнесены к видам *Lactobacillus johnsonii* или *Lactobacillus gasseri*. Данный факт ставит под сомнение однозначность декларируемых пробиотических свойств таких продуктов, поскольку не все штаммы, таксономически причисляемые к группе *Lb. acidophilus*, обладают доказанным позитивным эффектом на здоровье человека [51, 52]. Кроме того, не во всех коммерческих молочных продуктах с пробиотиками указывается используемый штамм, а также фактическое количество [53].

В современной таксономии выделено 30 видов бифидобактерий. Шесть родов, наиболее значимых для молочной промышленности, представлены в

таблице 1.1. Вместе с тем результаты исследований Кляйна с соавт. (1998) [54] указывают на то, что штаммовый состав пробиотических кисломолочных продуктов представлен преимущественно видом *B. animalis*, тогда как на потребительской упаковке производители чаще указывают вид *B. longum*.

Секвенирование 16S рРНК в пределах рода *Enterococcus* выявило наличие трех групп видов: *E. faecium* и *E. durans* находятся в первой группе, в то время как *E. faecalis* образует отдельную линию происхождения. При использовании этих микроорганизмов в пробиотических кисломолочных продуктах не следует забывать об их патогенности. Данных об использовании пробиотических дрожжей (*Saccharomyces boulardii*) в кисломолочных продуктах [55] недостаточно, и их применение наиболее вероятно при производстве кефира и кумыса. Другие бактерии, не относящиеся к молочнокислым микроорганизмам, включая *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* и *Clostridium butyricum* также используются в пробиотических продуктах по всему миру.

Таблица 1.1 – Пробиотические микроорганизмы, используемые при производстве кисломолочных продуктов

Род	Виды микроорганизмов
<i>Lactobacillus</i>	- <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lacticaseibacillus casei</i> (штаммы Shirota, Imunitass, NCC208) - <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (штамм GG) - <i>Lactobacillus johnsonii</i> - <i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus gasseri</i> - <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> - <i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. Paracasei</i> - <i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> - <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>breve</i> , <i>longum</i> , <i>adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae var. boulardii</i>

Кисломолочные продукты и пробиотические микроорганизмы являются полезными для здоровья [56]. Терапевтическое значение пробиотических организмов кратко представлено в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Влияние кисломолочных продуктов с пробиотиками на здоровье человека

Эффект	Предполагаемая польза
Пищеварительный тракт	<ul style="list-style-type: none"> - Активны в отношении <i>Helicobacter pylori</i> - Улучшают усвоение лактозы - Стимулируют иммунитет кишечника - Стабилизируют течение болезни Крона - Стимулируют перистальтику кишечника
Микрофлора кишечника	<ul style="list-style-type: none"> - Улучшают баланс между микробными популяциями (например, увеличивают количество бифидобактерий в фекалиях) - Снижают активность ферментов в фекалиях - Колонизируют кишечный тракт - Сокращают время носительства <i>Salmonella spp.</i>
Диарея	<ul style="list-style-type: none"> - Профилактика/лечение острой и ротавирусной диареи - Профилактика диареи, вызванной приемом антибиотиков - Лечение рецидивирующей диареи, вызванной <i>Clostridium difficile</i>
Другие эффекты	<ul style="list-style-type: none"> - Повышение иммунитета к болезням - Подавление некоторых видов рака - Снижение уровня холестерина в сыворотке крови - Снижение артериальной гипертензии

Lpb. plantarum занимает особое место среди пробиотиков из-за размера его генома, который является одним из крупнейших, обнаруженных в пределах рода *Lactobacillus* [57]. Данный микроорганизм обладает повышенной адаптивностью к питательным средам и может быть использован как для молочных систем, так и для фруктовых соков *Lpb. plantarum* может участвовать в различных биохимических реакциях с получением целевых биологически активных метаболитов [58]. Причиной этому служит тот факт, что *Lpb. plantarum* содержит множество внеклеточных ферментов, которые способствуют секреции и модификации белков, а также модификации и деградации внеклеточных соединений, что позволяет использовать такие молекулы в качестве источника питательных веществ [59]. В частности, ферменты танназа, β -глюкозидаза, α -глюкозидаза и β -галактозидаза, р-декарбоксилаза кумаровой кислоты и общая

декарбоксилаза катализируют производство фенольных соединений, которые положительно влияют на аромат пищи и увеличивают антиоксидантную активность [60].

Необходимым условием реализации положительного эффекта пробиотических микроорганизмов на организм человека является сохранение их жизнеспособности на протяжении всего срока хранения продукта и при прохождении через желудочно-кишечный тракт. В связи с этим Международная молочная федерация (1997) предложила критерии для идентификации кисломолочных продуктов, согласно которым продукт должен быть получен путем сбраживания специфическими микроорганизмами, приводящего к снижению pH и коагуляции белков. При этом данные микроорганизмы должны сохранять жизнеспособность и активность в количестве не менее 10^6 КОЕ/см³ на момент окончания срока годности. В свою очередь, пробиотики определяются как препараты или пищевые продукты, содержащие живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают благотворное влияние на здоровье макроорганизма путем нормализации кишечного микробиоценоза [49, 61]. Таким образом, оба определения ключевым условием эффективности продукта ставят поддержание жизнеспособности пробиотической культуры.

Однако пробиотический эффект может быть существенно снижен вследствие воздействия агрессивных факторов внутренней среды организма человека (низких значений pH желудочного сока, протеолитических ферментов, солей желчных кислот). С целью повышения жизнеспособности пробиотиков в пищевых продуктах и желудочно-кишечном тракте были проведены исследования их защиты путем микрокапсулирования с получением гидроколлоидных гранул [62]. Дополнительными преимуществами микрокапсулирования являются: защита клеток внутри гранул от бактериофагов [63], повышенная выживаемость при лиофилизации и замораживании [64-66].

1.2 Микроинкапсуляция как метод сохранения функциональных свойств пробиотиков

Микроинкапсуляция представляет собой процесс заключения вещества (активного агента) в оболочку из другого вещества. При этом инкапсулируемый компонент обозначается как основная (внутренняя) фаза, фаза заполнения, активная фаза или фаза полезной нагрузки. Материал, выполняющий защитную функцию, называют покрытием, мембраной, оболочкой, капсулой, материалом-носителем или внешней фазой (матрицей) [67, 68].

В пищевой промышленности применение инкапсуляции обусловлено несколькими причинами, ключевой из которых является возможность эффективной доставки биологически активных соединений и живых микроорганизмов в состав пищевых продуктов. Данный метод позволяет включать в рецептуры как лабильные нутрицевтики (антиоксиданты, витамины, минеральные вещества, фитостеролы, лютеин, жирные кислоты, ликопин), так и пробиотические культуры, обеспечивая их сохранность на всех этапах технологического цикла [67, 69]. Под инкапсулированием в большинстве случаев понимают технологию, при которой биоактивные компоненты полностью заключаются в физический барьер, обеспечивающий их изоляцию и защиту от неблагоприятных воздействий [69]. В более широком смысле этот процесс определяют, как упаковку твердых, жидких или газообразных веществ в миниатюрные капсулы, способные высвободить содержимое при определенных условиях [70]. Размер получаемых частиц может варьироваться от нескольких нанометров до нескольких миллиметров [67].

Первоначальное применение инкапсуляции в биотехнологии было обусловлено необходимостью оптимизации процессов культивирования за счет иммобилизации клеток в матрице, что упрощало выделение целевых продуктов. Технологические решения, предложенные около 60 лет назад, нашли широкое

использование в фармацевтике для создания систем контролируемого высвобождения, а в последние годы адаптируются для нужд пищевой отрасли. Актуальность данного направления обусловлена возрастающими требованиями к сохранности функциональных ингредиентов, характеризующихся низкой стабильностью при воздействии технологических факторов и физико-химических условий желудочно-кишечного тракта. Инкапсуляция рассматривается как эффективный подход к решению данной проблемы.

Цель инкапсуляции – защита биологически активных веществ и пробиотиков от деструкции при переработке и хранении, а также предотвращение их побочных реакций с пищевыми компонентами. Учитывая склонность таких соединений к быстрой инактивации (окислению, гидролизу), инкапсуляция позволяет замедлить или полностью исключить их разложение вплоть до достижения целевого отдела ЖКТ [71].

Таким образом, инкапсуляция позволяет сохранить функциональную активность биоактивных компонентов благодаря созданию физического барьера между чувствительным веществом и агрессивными факторами внешней среды. Помимо защитной функции, данная технология обеспечивает маскировку нежелательных органолептических свойств (неприятного вкуса или запаха), способствует стабилизации пищевых ингредиентов в процессе хранения и повышает их биодоступность при пероральном употреблении.

1.2.1 Обзор материалов для микроинкапсулирования

Для инкапсуляции веществ, находящихся в твердом, жидком или газообразном агрегатном состоянии, может применяться широкий спектр материалов. Однако требования к инкапсулирующим агентам, используемым в

пищевой промышленности, существенно жестче по сравнению с фармацевтическими препаратами. Многие соединения, успешно применяемые для инкапсуляции лекарственных средств, не получили одобрения для использования в пищевых системах, поскольку не имеют статуса «общепризнанных безопасных» (GRAS – Generally Recognized as Safe) материалов [72].

Материалы, применяемые для формирования оболочки капсул в пищевых технологиях, должны отвечать ряду требований: быть пищевыми, биоразлагаемыми, способными создавать надежный барьер между внутренней фазой и внешней средой, а также обеспечивать удержание активного вещества в процессе обработки и хранения. Важным условием является инертность материала по отношению к инкапсулируемому компоненту. Наибольшее распространение в пищевой промышленности получили биополимеры природного происхождения, в частности полисахариды. Среди них широко используются крахмал и его производные (амилоза, амилопектин, декстрины, мальтодекстрины, полидекстроза, сиропы), целлюлоза и ее производные, а также растительные эксудаты (гуммиарабик, трагакантовая камедь, карайя, мескитовая камедь), галактоманнаны и пектины. Помимо растительных полисахаридов, в пищевой инкапсуляции находят применение полисахариды морского происхождения – каррагинаны и альгинаты.

Помимо растительных полисахаридов, в технологиях инкапсулирования находят применение полисахариды микробиологического и животного происхождения – декстран, хитозан, ксантан и геллан. Наряду с углеводами, в качестве материалов для формирования оболочек широко используются белки и липиды, полученные как из натурального, так и модифицированного сырья. Среди белков наиболее распространены казеины, желатин и глютен. Липидные материалы, пригодные для пищевых целей, представлены жирными кислотами, жирными спиртами, восками (пчелиный, карнаубский, канделлиевый), а также глицеридами и фосфолипидами [67].

Выбор материала для инкапсуляции основывается на нескольких ключевых критериях: природе и механизме действия активного компонента, условиях его

применения, а также экономической эффективности процесса. Последний фактор (снижение затрат) нередко становится определяющим при подборе инкапсулирующих агентов в промышленных масштабах.

Полисахариды представляют собой полимерные макромолекулярные соединения, построенные из сахарных цепочек, в которых моносахаридные звенья соединены гликозидными связями. Согласно определению, к полисахаридам относят соединения, содержащие не менее десяти моносахаридных остатков [73]. В химическом отношении они являются не индивидуальными веществами, а смесями полимеров с различной степенью полимеризации. Многообразие химической структуры полисахаридов обуславливает широкий спектр их физико-химических свойств, включая усвояемость, влагоудерживающую способность, эмульгирующую активность и растворимость [73–77]. Наличие в структуре полисахаридов функциональных групп (амино-, карбоксильных и гидроксильных) открывает возможности для их химической или биохимической модификации с целью получения производных с заданными свойствами. Эти производные группы играют важную роль в процессах нековалентного взаимодействия с биологическими тканями (слизистыми оболочками, эпителиальными клетками), обеспечивая биоадгезивные свойства. Ряд полисахаридов, таких как хитозан, пектин, каррагинан, трегалоза, крахмал и альгинат, обладают биоадгезивной способностью, что позволяет использовать их в качестве носителей для инкапсуляции биологически активных соединений [78, 79].

Альгинат представляет собой природный анионный полисахарид, выделяемый из бурых водорослей. Его линейная неразветвленная структура образована остатками β -D-маннуроновой кислоты и α -L-гулууроновой кислоты, соединенных β -(1→4)-гликозидными связями [80]. Способность альгината к гелеобразованию обусловлена взаимодействием с двухвалентными катионами или поликатионами, что приводит к формированию прочных эластичных гелей и микрокапсул.

Благодаря отсутствию токсичности, биосовместимости с микроорганизмами, хорошим массообменным характеристикам, способности к

биодegradации и возможности проведения процесса инкапсуляции при комнатной температуре без использования органических растворителей, альгинат широко применяется для создания микрокапсулированных бактериологических препаратов [81–86]. Получаемые на его основе капсулы обладают высокой пористостью поверхности, причем размер пор может регулироваться изменением концентрации альгината [81–86].

Эффективность альгинатных систем подтверждена рядом исследований. Так, Хук с соавторами [84] инкапсулировали *Lactobacillus rhamnosus* в альгинатные микросферы, дополнительно стабилизированные наноцеллюлозой и лецитином, что позволило повысить выживаемость штамма в условиях желудка. Фариз и др. [85] использовали для инкапсуляции *Lactiplantibacillus plantarum* композицию альгината с ксантановой камедью с последующим покрытием хитозаном; полученная система обеспечивала рН-зависимое высвобождение пробиотика и улучшала его выживаемость в имитируемых условиях желудочно-кишечного тракта. Ван с соавторами [86] разработали систему на основе карбоксиметилцеллюлозы натрия, альгината натрия и хлорида кальция, формирующую сетчатую структуру оболочки. Полученные капсулы сохраняли стабильность в имитируемой желудочной жидкости (рН 1,2) в течение 3 часов, но разрушались в искусственной кишечной среде (рН 6,8) за 2 часа, что свидетельствует о выраженной рН-чувствительности материала.

Наряду с преимуществами, альгинатные микрокапсулы обладают определенными недостатками, включая ограниченную механическую прочность в процессе производства и относительно высокую стоимость. Для снижения затрат и повышения стабильности капсул альгинат натрия комбинируют с другими материалами, такими как глинистые минералы, крахмал или хитозан [87].

Белки и их изоляты, благодаря своей амфифильной природе, проявляют высокую эмульгирующую способность. Наряду с этим, их гелеобразующие, пленкообразующие и пенообразовательные свойства, а также склонность к самоассоциации в комплексы обуславливают перспективность использования белков в качестве материалов для инкапсуляции [88-92]. В последние годы

интерес к белкам как к материалам стенки для капсулирования биологически активных соединений (пробиотиков, жирных кислот, масел) неуклонно возрастает. Это обусловлено их происхождением из возобновляемых биологических источников, а также такими характеристиками, как безопасность, биосовместимость и высокая влагоудерживающая способность [89, 93, 94].

Пребиотики определяются как вещества, избирательно используемые микроорганизмами хозяина и приносящие пользу его здоровью. Согласно современным представлениям, эффективные пребиотики должны соответствовать трем основным критериям: 1) устойчивость к гидролизу желудочным соком и пищеварительными ферментами, а также отсутствие всасывания в верхних отделах желудочно-кишечного тракта; 2) способность метаболизироваться кишечной микрофлорой; 3) избирательная стимуляция роста или метаболической активности кишечных микроорганизмов, ассоциированная с положительным влиянием на здоровье [95, 96].

Будучи трудноперевариваемыми соединениями, пребиотики выполняют ряд важных функций: они служат питательным субстратом для пробиотических культур, повышают их устойчивость к неблагоприятным факторам (кислой среде, высокой температуре, обезвоживанию) и подавляют рост потенциально патогенных микроорганизмов, тем самым снижая конкурентное давление на пробиотические штаммы в кишечнике [95, 97].

Термин «пребиотики» исторически применяется преимущественно к углеводам [98]. Наиболее изученными и широко используемыми пребиотиками в настоящее время признаны инулин, олигофруктоза и олигогалактоза. К числу новых пребиотических соединений относят также другие функциональные олигосахариды - олигоизомальтозу, олигосилозу и олигоманнозу [99]. В последние годы высказываются предположения, что пребиотическим потенциалом могут обладать и некоторые неуглеводные вещества, включая полифенолы, минералы, полиненасыщенные жирные кислоты и пептиды соевого белка [100, 101].

Принято выделять три основные категории пребиотиков: олигосахариды, полиолы и растворимые пищевые волокна. Данные соединения оказывают выраженное оздоровительное действие при ряде патологических состояний, включая острый гастроэнтерит, запоры, диабет, онкологические и иммунные нарушения.

В исследовании Ли с соавторами [102] было показано, что инулин способен нивелировать нарушение кишечного барьера, вызванное воздействием наночастиц диоксида титана анатаза. Предполагаемый механизм связан с увеличением численности бифидобактерий в кишечнике и активацией экспрессии генов, кодирующих белки плотных контактов в эпителиальных клетках. Данный факт свидетельствует о потенциальной роли пребиотиков в поддержании функций желудочно-кишечного тракта и гомеостаза кишечного барьера.

Позитивное влияние пребиотиков на целостность кишечного эпителия может быть также опосредовано продуктами их метаболизма – короткоцепочечными жирными кислотами (КЦЖК). Избирательная ферментация пребиотиков кишечной микробиотой приводит к образованию КЦЖК, которые, в свою очередь, способны регулировать экспрессию барьерных генов за счет ингибирования гистондеацетилаз в эпителиальных клетках кишечника [103, 104].

Благодаря высокой биологической активности пребиотики находят применение в качестве ростовых факторов при культивировании пробиотических штаммов. Ряд исследований подтвердил эффективность использования пребиотиков для инкапсуляции пробиотических культур [105]. Совместная инкапсуляция (кокапсуляция) пробиотиков с пребиотиками позволяет поддерживать их жизнеспособность и экологическую устойчивость. Согласно современным представлениям, двумя наиболее эффективными подходами к доставке пробиотиков являются: 1) использование пребиотиков в качестве материала для инкапсуляции, обеспечивающего защиту пробиотических клеток; 2) совместная доставка пребиотиков и пробиотиков в толстую кишку (синбиотические композиции) [106, 107].

Продукты реакции Майяра (ПРМ) – сложные смеси соединений, образующихся при взаимодействии восстанавливающих сахаров с аминокислотами, пептидами или белками [108]. Они обладают высокой растворимостью, эмульгирующей и антиоксидантной активностью, стабильны в широком диапазоне рН и температур, что делает их перспективными носителями для доставки биоактивных веществ [109].

Исследования подтверждают эффективность ПРМ в инкапсуляции. Так, ПРМ сывороточного белка с олигосахаридами повысили биодоступность ликопина с 16% до 60% [110]. Микрокапсулы на основе ПРМ сывороточного белка с олигомерной изомальтозой обеспечили высокую степень инкапсуляции *L. rhamnosus* (88,88%) и защиту пробиотика в условиях ЖКТ [111]. ПРМ изолята соевого белка с каррагинаном успешно использованы для капсулирования *B. longum*, продемонстрировав защитный эффект при моделировании пищеварения [112].

Реакция Майяра протекает в три стадии [113–116]. На начальной стадии образуются основания Шиффа и продукты перегруппировки Амандори без изменения цвета и вкуса [113, 114]. На средней стадии в зависимости от рН формируются фурфуролы, восстановленные кетоны или продукты расщепления, появляются желтая окраска и антиоксидантные свойства [115]. На поздней стадии образуются темноокрашенные меланоидины и потенциально токсичные соединения, ассоциированные с риском развития некоторых заболеваний [116]. Контроль условий реакции позволяет получать ПРМ с заданными свойствами, избегая нежелательной конечной стадии.

Несмотря на перспективность ПРМ для микрокапсулирования, разработка новых продуктов и изучение их поведения в процессах инкапсуляции остаются недостаточно исследованными, что ограничивает их практическое применение.

Ключевым требованием к материалу-носителю при микроинкапсуляции пробиотиков является обеспечение их жизнеспособности на всех этапах технологического процесса и при прохождении через желудочно-кишечный тракт. Этим требованиям в полной мере отвечает альгинат натрия, который:

- образует гидрогелевые капсулы в мягких условиях, исключая термическое или химическое повреждение клеток;
- создает эффективный барьер против кислот и ферментов желудочного сока;
- обеспечивает высвобождение пробиотиков в кишечнике за счет деградации при нейтральных значениях pH.

Совокупность указанных свойств, а также данные литературы об успешном применении альгината для защиты пробиотических штаммов [82–85] послужили основанием для выбора данного материала в качестве носителя.

1.2.2 Обзор методов микроинкапсулирования

В настоящее время разработано множество методов микроинкапсуляции, применяемых в пищевой промышленности. Учитывая, что инкапсулируемые вещества и материалы оболочек часто находятся в жидкой форме, значительная часть технологий базируется на процессах сушки. К числу наиболее распространенных методов инкапсуляции биологически активных соединений относятся распылительная сушка, сушка в псевдооживленном (аэрозольном) слое, нанесение покрытий в псевдооживленном слое, а также методы распылительного охлаждения и распылительной инъекции расплава [117, 118].

Метод распылительной сушки позволяет получать частицы высокого качества размером менее 40 мкм [118], что является важным преимуществом с точки зрения сенсорных и текстурных характеристик конечных продуктов. Согласно литературным данным, около 80–90% всех инкапсулированных продуктов производятся именно методом распылительной сушки, тогда как остальные 10–20% приходятся на такие технологии, как распыление

(распылительное охлаждение/распылительная инъекция расплава), сублимационная сушка, экструзия расплава и инъекция расплава [119, 120].

Методы экструзии основаны на диспергировании водного раствора полимера (чаще всего 0,6–3% раствора альгината натрия) в гелеобразующую ванну, содержащую, в случае альгината, 0,05–1,5 М раствор хлорида кальция. Для формирования капель могут использоваться различные устройства: пипетки, шприцы, вибрирующие насадки, распылительные форсунки, струйные резакки или распылительные диски [67].

Среди экструзионных методов особого внимания заслуживает технология JetCutter, признанная наиболее перспективной для крупномасштабного промышленного применения [121]. Для получения субмикронных частиц (до 50 мкм) эффективна электростатическая экструзия. Альтернативным подходом является коэкструзия, позволяющая получать сферические микрочастицы с гидрофобным ядром и гидрофильной или гидрофобизированной оболочкой [122].

Другим распространенным методом инкапсуляции является эмульгирование, применяемое преимущественно для водорастворимых пищевых активных веществ. В зависимости от поставленной задачи используются различные типы эмульсий: прямые (масло/вода), обратные (вода/масло), а также множественные эмульсии (вода/масло/вода). Эмульсии типа масло-в-воде могут быть в дальнейшем высушены методами распылительной или сублимационной сушки [123].

Методы распылительного охлаждения (spray cooling) и распылительного отверждения (spray chilling) основаны на покрытии активных веществ липидной оболочкой. Различие между ними заключается в температуре плавления используемых липидов: при распылительном охлаждении она составляет 34–42°C, а при распылительном отверждении используется более высокая температура. В обоих случаях формирование частиц происходит при пониженных температурах по технологии, аналогичной распылительной грануляции в псевдооживленном слое [123, 124].

Технология нанесения покрытия в псевдооживленном слое (fluidized bed coating) заключается в обработке частиц порошка, взвешенных в воздушном потоке с заданной температурой, распыляемым материалом покрытия. Процесс может осуществляться как в периодическом, так и в непрерывном режиме. В качестве материалов для покрытия используются водные растворы производных целлюлозы, крахмала, а также белки и смолы [123].

Вакуумная и сублимационная сушка представляют собой технологически сходные процессы, однако вакуумная сушка является более быстрым и экономичным методом, поскольку проводится при температурах выше точки замерзания растворителя. Основными недостатками сублимационной сушки выступают высокая энергоемкость и продолжительность процесса. Кроме того, формируемая в ходе сублимационной сушки высокопористая структура стенки капсулы обеспечивает низкую барьерную функцию, что ограничивает применение данного метода в случаях, требующих пролонгированного высвобождения активного вещества [124].

Ряд методов инкапсуляции, таких как включение молекул в циклодекстрины или липосомальные везикулы, позволяют придавать биологически активным веществам специфические свойства, однако их более высокая стоимость ограничивает широкое промышленное применение. Циклодекстрины характеризуются наличием липофильной внутренней полости, способной обратимо захватывать активные молекулы подходящего размера в водной среде. Лимитирующим фактором является небольшой диаметр входного отверстия циклодекстринового кольца, ограничивающий загрузочную емкость метода [124].

Липосомы представляют собой везикулярные структуры размером от 30 нм до нескольких микрон, формирующиеся за счет гидрофильно-гидрофобных взаимодействий между фосфолипидами и молекулами воды.

Выбор нами метода экструзии непосредственно связан с выбором альгината натрия в качестве материала-носителя. Экструзионная технология идеально адаптирована для альгинатных систем, поскольку позволяет реализовать

механизм ионотропного гелеобразования при контакте капле альгината с раствором CaCl_2 . Формирование капсул происходит мгновенно в мягких условиях, что обеспечивает высокую инкапсуляционную эффективность и сохранность пробиотических клеток. Простота аппаратного оформления, возможность регулирования размера частиц и масштабируемость метода [124] также явились определяющими факторами при его выборе.

1.3 Использование технологии микроинкапсулирования в производстве продуктов функционального питания

Производство ферментированных продуктов широко распространено в различных регионах и странах. Основу получения кисломолочных продуктов составляет процесс молочнокислого брожения, осуществляемый преимущественно лактобациллами, хотя способностью к продукции лактата обладают также бифидобактерии и другие микроорганизмы. Особое значение среди молочнокислых бактерий придается штаммам *L. acidophilus*, *L. casei* и *L. rhamnosus*, которые находят широкое применение в промышленности. Молочнокислые микроорганизмы характеризуются выраженным пробиотическим эффектом, который не ограничивается только позитивным влиянием на кишечную микрофлору. Благодаря высокой метаболической и иммуномодулирующей активности пробиотики непосредственно участвуют в регуляции обменных и иммунологических процессов организма-хозяина. Механизмы их действия многообразны и включают:

- ингибирование роста патогенных микроорганизмов;
- стимуляцию развития полезной микрофлоры;
- улучшение всасывания кальция, фосфора и железа;

- антиканцерогенное и антитоксическое действие;
- гипохолестеринемический эффект;
- иммуномодуляцию, обеспечивающую поддержание адекватного уровня антиинфекционной защиты.

Антимикробная активность пробиотических штаммов молочнокислых и бифидобактерий способствует поддержанию кишечного гомеостаза и позволяет использовать пробиотики для усиления или коррекции действия антибиотиков, а в ряде случаев – в качестве их альтернативы. При этом установлены существенные межштаммовые различия в спектрах антибактериальной активности, влиянии на иммунную систему и метаболические процессы. Расширение областей применения пробиотиков в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности обуславливает необходимость создания новых препаратов с заданными характеристиками, адекватных по составу, качеству и способам применения.

Инкапсуляция представляет собой эффективный способ защиты биологически активных веществ (липидов, витаминов, пептидов, жирных кислот, антиоксидантов, минералов) и живых клеток (пробиотиков) путем их покрытия защитным материалом. Основными преимуществами данной технологии являются:

- предотвращение испарения, химических реакций и миграции активных компонентов в пищевых матрицах;
- обеспечение контролируемой доставки и сохранение стабильности биологически активных соединений при обработке и хранении;
- исключение нежелательных взаимодействий с другими ингредиентами продукта;
- маскировка неприятных органолептических свойств.

Микроинкапсуляция позволяет доставлять биологически активные компоненты в заданное время и в нужный отдел желудочно-кишечного тракта, что является ключевым условием реализации их функционального потенциала. Особый интерес представляет совместная инкапсуляция двух и более

компонентов для достижения синергетического эффекта. Можно предположить, что микроинкапсулированные биологически активные вещества будут играть важную роль в повышении эффективности функциональных продуктов питания в ближайшем будущем.

Технология иммобилизованных клеток обладает рядом преимуществ, включая высокую производительность непрерывного брожения и эффективность процесса. Однако, несмотря на тридцатилетнюю историю исследований, многие вопросы, связанные с промышленным применением иммобилизованных культур, остаются нерешенными. Технические проблемы включают выбор оптимального носителя и конструкции реактора, а также влияние процесса иммобилизации на органолептические характеристики конечного продукта.

Существует объективная потребность в разработке технологических решений, обеспечивающих высокую производительность процессов при сохранении надлежащего качества готовой продукции. Будущие исследования должны быть направлены на:

- преодоление разрыва между лабораторными разработками и требованиями крупномасштабного производства;
- совершенствование существующих производственных технологий;
- подбор новых технологических режимов и материалов-носителей;
- разработку методов консервации и хранения, адаптированных для промышленного внедрения.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация работы и схема проведения исследований

Экспериментальные исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории «Пищевой и промышленной биотехнологии», лабораториях кафедры прикладной биотехнологии Северо-Кавказского федерального университета; научно-исследовательской лаборатории «Прикладных проблем биологии» Белорусского государственного университета; лаборатории молочнокислых и бифидобактерий Института микробиологии НАН Беларуси. Исследования проводились в соответствии со схемой, представленной на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 – Схема проведения исследований

2.2 Требования к объектам исследований и экспериментальным установкам

Объектами исследований являлись:

- штамм *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 (далее *Lpb. plantarum*), полученный из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси;
- микрокапсулы с *Lpb. plantarum* различных размеров;
- образцы молока, ферментированные культурами *Str. thermophilus* и инкапсулированными *Lpb. plantarum*.

В качестве сырья использовали:

- молоко коровье, стерилизованное с массовой долей жира 1,0 %, 1,5 %, 2,5 %, белка не менее 2,8 %, кислотностью не более 22,0 °Т, плотностью не менее 1027 кг/см³, соответствующее требованиям ГОСТ Р 31450-2013 [125];

В качестве заквасок были использованы:

- БК-Углич-ТВ производства ФГУП «Экспериментальная биофабрика» Россельхозакадемии, г. Углич;
- БК *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

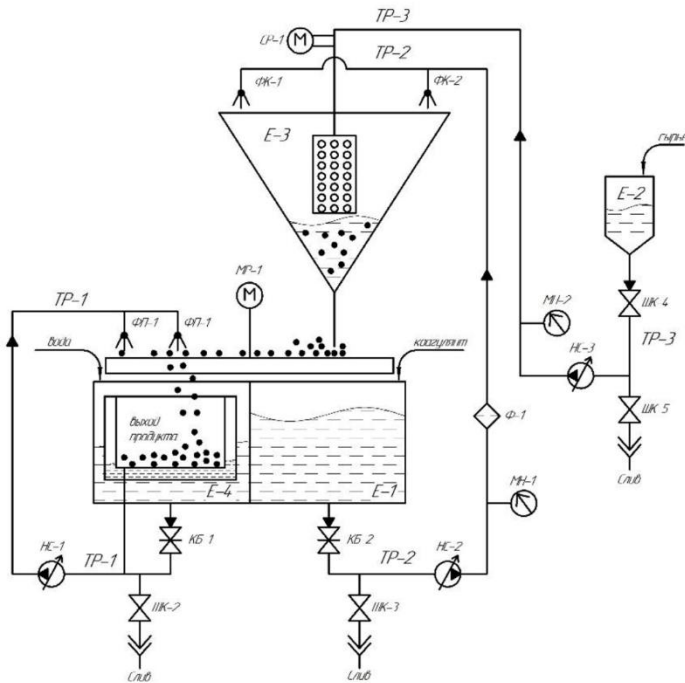
Средой для культивирования *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 являлся пермеат, полученный путем ультрафильтрации подсырной молочной сыворотки (установка мембранной фильтрации TestUnit M20, Alfa Laval, Швеция) на АО «Молочный комбинат «Ставропольский», Россия.

Для микроинкапсулирования использовали материал – альгинат натрия (E 401) STOING (Китай) и коагулянт – хлорид кальция пищевой безводный STOING (Китай).

Микроинкапсулирование *Lpb. plantarum* проводили на экспериментальной установке ИИ 0.35-1.5 (ООО «МЗТА», г. Муром, Россия). Установка

предназначена для микрогранулирования лактобактерий и других объектов методом экструзии.

Конструкция установки многофункциональная и позволяет получать капсулы различного размера с различной производительностью (рисунок 2.2).



1. Ёмкость для дисперсной системы
2. Регулируемый насос подачи дисперсной системы
3. Регулируемый привод диспергатора
4. Вращающийся диспергатор
5. Ёмкость для коагулянта
6. Насос подачи коагулянта
7. Форсунки распыления коагулянта
8. Привод вращения стола промывки
9. Вращающийся стол промывки капсул
10. Форсунки для подачи промывной воды
11. Ёмкость для сбора готовых капсул

Рисунок 2.2 – Технологическая схема установки ИИ 0.35-1.5 для гранулирования (микрокапсулирования) коллоидного сырья в микрогранулы

При проведении экспериментальных исследований были использованы следующие приборы и оборудование:

- бинокулярный микроскоп «Primo Star» с цифровой камерой Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss, Германия);
- вискозиметр «Brookfield DV-E» [126];
- термометр лабораторный ГОСТ 29224-91 [127];
- рН-метр-милливольтметр «рН-150» МИ [128];
- термостат лабораторный «ТС-1/80 СПУ», изготовленный по ТУ-9452 002-00141798-97.
- спектрофотометр UNICO 2800 UV/VIS (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США);
- центрифуга «MicroCl 17 R» (компании Thermo Fisher Scientific, США);

- встряхиватель медицинский вибрационный Vortex V – 3 (SIA «ELMI» / Латвия);
- шейкер-инкубатор ES 20/60 (SIA Biosan, Латвия);
- весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104-88, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и поверочной ценой деления не более 2 мг;
- лазерный дифракционный анализатор размера частиц «Ласка-ТД», БиоМедСистем, Россия; Госреестр СИ РФ № 72792-18;
- газовый хроматограф Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975B (Agilent Technologies, USA);
- вискозиметр капиллярный стеклянный ВПЖ-1 с диаметром 0,54 мм;
- анализатор рентгенофлуоресцентный энергодисперсионный, РЕАН03.Н (АО «Научные приборы, Санкт-Петербург, Россия»);
- термоаналитическая система ТА-4000 «Mettler Toledo» (Швейцария).

2.3 Методы экспериментальных исследований

В настоящей работе для определения физико-химических и микробиологических показателей объектов исследований и технологических процессов использовались следующие общепринятые и стандартные методы:

- отбор и подготовка проб к анализу по ГОСТ 26809.1-2014 [129];
- кислотность активная – потенциметрически по ГОСТ Р 54669-2011 [130] и по инструкции к прибору;
- кислотность титруемая – методом титрования по ГОСТ Р 54669-2011 [130];
- температура по ГОСТ 26754-85 [131];

- отбор и подготовку проб для микробиологического анализа проводили по ГОСТ 26809.1-2014 [129]; культивирование микроорганизмов – по ГОСТ 26670-91 [132];

- для определения жизнеспособности клеток *Lpb. plantarum* внутри микрокапсул был проведен стандартизированный микробиологический анализ в соответствии с ГОСТ 10444.11–2013;

- внешний вид, вкус, запах, консистенция органолептически в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22935 2-2011 [133].

2.3.1 Морфология и размер микрокапсул

Морфологическую оценку проводили с помощью светового микроскопа Axio ZOOM.V16 (Carl Zeiss Microscope, Оберкохен, Германия), работающего при 50-кратном увеличении. Эта система с высоким разрешением позволила получить детальную визуализацию и точное измерение морфологии микрокапсул в различных производственных условиях [134]. Образцы были аккуратно помещены на предметные стекла микроскопа и исследованы в контролируемых условиях для оценки структурной целостности и однородности размеров. Дополнительный гранулометрический анализ был проведен с использованием лазерной дифракционной спектроскопии с анализатором размера частиц Laska-TD (BioMedSystem, Санкт-Петербург, Россия). Этот метод позволил получить количественные данные о распределении частиц по размерам, что является важным параметром для оценки однородности микрокапсул [135].

2.3.2 Определение количества сублимированных микрокапсул

Для определения количества сублимированных микрокапсул в грамме продукта была применена аналитическая процедура. Метод включал приготовление точной пробы микрокапсул весом 10 мг для каждой категории по размеру. Перед количественным определением образцы подвергались тщательной подготовке для обеспечения равномерного распределения и предотвращения образования комочков. Количественный анализ проводили с использованием увеличительного стекла с кратностью увеличения в 2,5 раза, что позволило точно подсчитать количество отдельных микрокапсул в образце. Затем полученные

значения были математически пересчитаны для определения количества микрокапсул на грамм сублимированного материала, выраженного в единицах измерения на грамм (шт/г).

2.3.3 Насыпная плотность

Насыпную плотность определяли путем добавления 2 г пробы в пустой мерный цилиндр объемом 10 мл. Цилиндр встряхивали, удерживая его на вибрационном столе в течение 2 мин. Насыпная плотность была рассчитана с использованием следующего уравнения:

$$P_b = \frac{m}{V}, \quad (1)$$

где P_b – насыпная плотность (кг/м³),

m – масса образца (кг),

V – объем, занимаемый цилиндром (м³).

2.3.4 Влияние замораживания гидратированных капсул на их размер

Для изучения влияния замораживания на размер микрокапсул и их структурную целостность был проведен эксперимент. Исследование началось с контролируемого замораживания гидратированных микрокапсул при температуре -18 °С в течение 48 часов, чтобы вызвать образование кристаллов льда внутри микрокапсул. После замораживания образцы подвергли контролируемой процедуре оттаивания. Замороженные микрокапсулы суспендировали в дистиллированной воде в соотношении 1:10 при поддержании постоянной температуры 25 °С. Этот этап позволил восстановить первоначальную структуру микрокапсул, одновременно позволив наблюдать за любыми изменениями размера, вызванными процессом замораживания. Затем размороженные образцы были подвергнуты детальному анализу размера с использованием лазерного дифракционного анализатора размера частиц Laska-TD (BioMedSystem, Санкт-Петербург, Россия). Был рассчитан средний объем гидратированной микрокапсулы как до, так и после замораживания, а также выход внутренней фазы для каждого из размеров. Полученные данные позволили всесторонне оценить влияние замораживания на размеры и внутреннюю структуру

микрокапсул, что позволило получить информацию о стабильности и функциональности капсулированного *Lpb. plantarum* в криогенных условиях.

2.3.5 Разрушение оболочек микрокапсул

Для исследования стабильности и структурной целостности оболочек микрокапсул был использован метод, включающий удаление ионов Ca^{2+} с помощью 0,1 моль/л раствора ЭДТА [136]. Экспериментальная процедура началась с подготовки образцов капсул различных размеров по 100 мг. Эти образцы были аккуратно помещены в пробирки, в которые затем был добавлен контролируемый объем раствора ЭДТА в количестве 0,1 моль/л. Объем раствора ЭДТА постепенно увеличивали до тех пор, пока не было визуально подтверждено полное разрушение микрокапсул. В ходе эксперимента проводилось тщательное наблюдение за постепенным разрушением оболочек микрокапсул. Было зафиксировано количество раствора ЭДТА, необходимое для полной дестабилизации микрокапсул разного размера. Количественные данные впоследствии были использованы для расчета количества связанных ионов Ca^{2+} в матрице микрокапсул. Кроме того, путем соотнесения содержания кальция с количеством карбоксильных групп, присутствующих в структуре альгината кальция, были определены основные требования к сохранению целостности инкапсулированной формы.

2.3.6 Определение кинематической вязкости капсул

Для определения кинематической вязкости капсул после их обработки 0,1 моль/л ЭДТА использовался вискозиметр капиллярный стеклянный ВПЖ-1 с диаметром 0,54 мм.

Для расчёта кинематической вязкости жидкости использовалась формула

$$V = \frac{g}{980,7} T, \quad (2)$$

где V – кинематическая вязкость жидкости в сантистоксах;

T – время истечения жидкости в секундах;

g – ускорение силы тяжести в месте измерения в см/сек².

2.3.7 Определение количества альгината в капсулах

Для определения содержания альгината в микрокапсулах была использована многоступенчатая процедура выделения. Процесс начался с предварительной обработки капсул раствором ЭДТА 0,1 моль/л, который эффективно хелатировал ионы Ca^{2+} из матрицы микрокапсул, разрушая структуру сшитого альгината. После обработки ЭДТА в пробирки переносили по 5 мл смеси капсул с ЭДТА. Затем к каждому образцу добавляли трехкратный объем 96%-ного этилового спирта, чтобы вызвать осаждение альгината [137]. Полученный осадок собирали центрифугированием при 4500 g в течение 20 минут. Выделенный осадок подвергали сублимационной сушке для удаления остаточной влаги, что позволило точно определить массу. Затем высушенный материал подвергли гравиметрическому анализу для количественного определения содержания альгината кальция в микрокапсулах.

2.3.8 Определение количества кальция в капсулах

Для определения количества кальция, связанного с альгинатом в стенках микрокапсул, использовался рентгенофлуоресцентный энергодисперсионный анализатор REAN03 (Scientific Instruments, Санкт-Петербург, Россия). Была подготовлена серия калибровочных эталонов, содержащих известную массу кальция, для построения калибровочной кривой. Данная кривая служила эталоном для количественного определения содержания кальция в образцах микрокапсул. Во время анализа подготовленные образцы микрокапсул были помещены в держатель для образцов прибора. Затем анализатор REAN03 измерял характерную рентгеновскую флуоресценцию, испускаемую атомами кальция в образцах. Содержание кальция было точно определено в мг/г путем сравнения этих измерений с ранее установленной калибровочной кривой.

2.3.9 Термогравиметрический анализ капсул с *Lpb. plantarum*

Термогравиметрическим методом анализировались лиофильно высушенные капсулы различных размеров. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы TA-4000 «Mettler Toledo» (Швейцария). Точная масса исследуемых навесок ~ 20 мг. Использовалось программирование

температуры в диапазоне 30–600 °С, скорость подъема температуры - 5 °С /мин. Время проведения анализа – 120 мин. [138].

Исходя из того, что потеря массы вещества при горении подчиняется уравнению кинетики первого порядка и соблюдается линейная зависимость – $\ln 100/100-\Delta m$ от $T (K_0)$, расчет энергии активации (E_a) проводят с помощью математической обработки ДТГ-кривой по методу А. Broido.

$$\ln (\ln 100/100-\Delta m) = E_a/R + 1/T + C, \quad (3)$$

где Δm – потеря массы в %,

T – температура в K_0 ,

R – универсальная газовая постоянная,

E_a – $\text{tg } \varphi - 8.31$,

C - const.

2.3.10 ГХ-МС состава биологически активных веществ капсул с *Lpb. plantarum*

Для анализа биологически активных веществ *Lpb. plantarum*, которые входят в состав капсул, проводилась их экстракция метанолом в соотношении 1:10. Полученные экстракты фильтровали через фильтр 0,45 мкм.

Состав биологически активных веществ полученных экстрактов исследовался с использованием хромато-масс-спектрометрической системы: газовый хроматограф Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975B (Agilent Technologies, USA). Для анализа использовалась капиллярная колонка DB-5MS (5 % Phenyl Methyl Siloxane, J&W 122-5062) длиной 30 метров, внутренним диаметром 0,25 мм. Температура инжектора – 300 °С, температура интерфейса – 300 °С. Газ-носитель – гелий, объемная скорость газа-носителя – 1 мл/мин. Температурная программа: начальная температура термостата – 35 °С, подъем температуры со скоростью 5 °С/мин. до 170 °С (изотермический режим в течение 7 минут); подъем температуры со скоростью 7 °С/мин. до 280 °С (изотермический режим в течение 10 минут). Время анализа 59,71 минут. Объем пробы 1 мкл, ввод пробы со сбросом 70:1. Параметры масс-детектора: температура источника – 230 °С, температура квадруполя – 150 °С.

Идентификация компонентов по масс-спектрам (с использованием библиотеки масс-спектров NIST). Определялось относительное содержание индивидуальных соединений в % от массы экстрактивных веществ [139]. Для количественного определения индивидуальных соединений использовался внутренний стандарт бергаптен с концентрацией 1 мг/мл.

2.3.11 Выживаемость в условиях, имитирующих ЖКТ

Проводили исследования сравнительной выживаемости как инкапсулированных клеток *Lpb. plantarum*, так и свободной культуры на разных этапах переваривания.

Для этого образцы инкубировали в термошейкере ES 20/60 (Biosan, Latvia) 120 минут при температуре 37 °С и встряхивании 120 об/мин. после добавления HCl и 0.1 % свиного пепсина (рН=2). Далее нейтрализовали 1 М NaOH до рН 7.0, добавляли смесь панкреатина и желчного экстракта и инкубировали при температуре 37 °С и встряхивании 120 об/мин. в течение 180 минут. После обработки на каждом этапе готовили серии последовательных разведений образцов микрокапсул, содержащих *Lpb. plantarum*, в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-10} . Из каждого разведения осуществляли посеы аликвоты по 1 мл в три отдельные пробирки, содержащие стерилизованную питательную среду, для обеспечения статистической достоверности. После посева образцы инкубировали при 30°С в течение 48 часов для обеспечения роста бактерий. По завершении инкубационного периода проводили визуальный подсчет колоний, чтобы определить количество колониобразующих единиц (КОЕ) на см³ суспензии или грамм сублимированных микрокапсулы.

2.3.12 Динамическая вязкость

Определение вязкости образцов проводили на ротационном вискозиметре BROOKFIELD DV-E. Принцип работы вискозиметра основан на вращении специального измерительного шпинделя, погруженного в образец, посредством калиброванной спиральной пружины. Вязкое трение жидкости о шпиндель определяется по закручиванию приводной пружины, которое измеряется датчиком угла вращения. Измерительный комплекс состоит из вискозиметра,

лабораторного штатива, набора шпинделей. Измерение вязкости производили с помощью шпинделей при температуре образцов 20 °С. Погружали шпиндель в образец по центру контейнера до тех пор, пока уровень жидкости не достигнет канавки на валу шпинделя. Для измерения вязкости задавали скорость вращения, в зависимости от выбранного шпинделя [126].

2.3.13 Определение антиоксидантной активности методом ABTS

Сущность методики заключается в ингибировании ABTS радикала антиоксидантом дигидрохверцетином, капсулированном в КСБ и лиофильно-высушенного. 0,1 г пробы растворили в 5 мл 60% этанола и дважды отобрали аликвоту: через 30-60 сек после добавления этанола (для определения свободного антиоксиданта) и второй раз через 15-20 мин. После энергичного встряхивания пробы поместили в пробирки типа «Эппендорф» ($V=2\text{мл}$) и отцентрифугировали на центрифуге MicroCl 17R в течение 15 мин. при скорости 13000 об/мин.

Раствор ABTS приготовили растворённым в воде концентрацией 7 моль. Катион радикал ($\text{ABTS}^{\circ+}$) был получен смешением раствора 2,45 моль (конечная концентрация) персульфата калия. Раствор после смешения находился в тёмном месте при комнатной температуре в течение 12-16 часов. Оптическая плотность при длине волны 735 нм должна соответствовать $0,70 \pm 0,02$.

Анализ проводили на спектрофотометре. В кювету, толщиной слоя 1 см, помещали 1,98 мл раствора ABTS и 0,02 мл отцентрифугированного раствора пробы. Оптическую плотность определили через 3 мин. Процент ингибирования определился по степени уменьшения окраски ABTS радикала.

Все экспериментальные исследования проводились не менее чем в трех повторностях для обеспечения надежности и точности данных. Это позволило провести статистическую проверку результатов и свести к минимуму возможные экспериментальные ошибки. Статистический анализ проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$). Линейная корреляция между группами была выявлена с использованием коэффициента корреляции Пирсона и выражена в виде корреляционных тепловых

карт. Кроме того, для построения линейных графиков был применен пакет анализа данных Microsoft Office Excel 2016 (корпорация Microsoft, США).

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗМЕРА МИКРОКАПСУЛ НА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Исследование морфологии гидратированных и сублимированных микрокапсул, полученных методом экструзии

Одним из широкоиспользуемых методов для получения микрокапсул с лактобактериями является метод экструзии [140-142]. Этот метод основан на подаче дисперсной системы, состоящей из лактобактерий и альгината натрия, через сопла различного размера в капсуляторе под давлением (рисунок 3.1). В результате этого процесса образуются капли гелеобразной фазы определенного размера. Размер получаемых капсул можно регулировать, регулируя диаметр сопла капсулятора. После этого капли попадают в сосуд, содержащий раствор коагулянта хлорида кальция. Этот этап способствует образованию нерастворимой в воде оболочки из альгината кальция вокруг капсул [143].

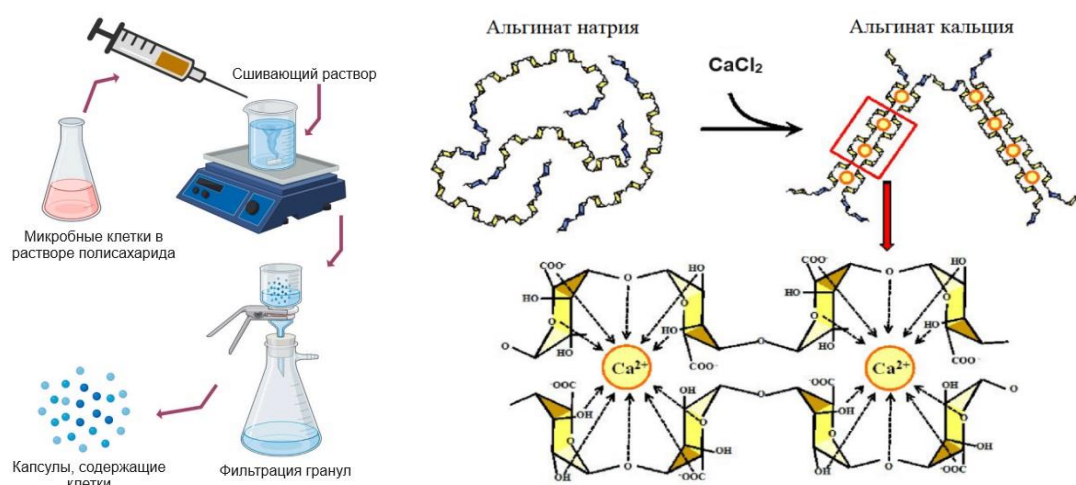


Рисунок 3.1 – Механизм образования капсул с альгинатом натрия методом экструзии

Физико-химические свойства полученных капсул можно изменять путем изменения концентрации альгината натрия и продолжительности процесса коагуляции. После коагуляции гидратированные капсулы отделяют от раствора коагулянта и тщательно промывают водой для завершения процесса [144]. Однако стоит отметить, что этот метод имеет ряд ограничений, в первую очередь низкую эффективность производства и отсутствие возможности автоматизации. Для устранения этих недостатков был разработан капсулятор ИИ 0,35-1,5, предназначенный специально для производства микрокапсул, содержащих либо лактобактерии, либо биологически активные вещества (рисунок 3.2). Это инновационное оборудование значительно повышает эффективность и масштабируемость процесса производства микрокапсул.



Рисунок 3.2 – Установка ИИ 0.35-1.5 (ООО «МЗТА», г. Муром)

В качестве объекта исследований был выбран штамм *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси). Бактерии *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 поддерживались в жидкой питательной среде MRS путем субкультивирования. Для длительного хранения бактерии лиофилизировали с использованием криозащитной среды, включающей обезжиренное сухое молоко и сахарозу. Для восстановления лиофильно высушенной культуры *Lpb. plantarum* БИМ-В 492 использовали пермеат, полученный путем ультрафильтрации подсырной молочной сыворотки. Активизацию проводили путем добавления к 1,0 г лиофилизированных бактерий 20 мл пастеризованного пермеата, термостатировали 30 минут при оптимальной температуре (30 °С). Затем восстановленную культуру вносили в основной объем пастеризованного пермеата, тщательно перемешивали и инкубировали при 30 °С в течение 24 ч для накопления биомассы.

В качестве контроля отбирали 200 мл готовой культуры и замораживали для последующего сублимирования.

Для получения микрокапсул различного размера готовили дисперсную систему, состоящую из дисперсной фазы – активированных в пермеате *Lpb. plantarum* БИМ-В 492, и дисперсной среды – 2 % раствора альгината натрия в соотношении 1:9. Полученную смесь объемом 2 литра помещали в емкость для дисперсной системы (рисунок 2.2). Процесс микроинкапсулирования *Lpb. plantarum* состоял из 4 стадий, проводимых в асептических условиях.

На первой стадии из емкости, содержащей дисперсную систему из альгината натрия и лактобактерий, подавали под давлением на диспергатор (рисунок 2.2). Изменяя частоту (Гц) напряжения, подаваемого на двигатель насоса коагулянта (рисунок 2.2), можно менять его обороты и регулировать давление подаваемой жидкости. Это позволяет в широких пределах менять производительность процесса получения микрокапсул. Нами использовалась средняя частота напряжения – 24,5 Гц, рекомендованная производителями установки.

На второй стадии смесь под заданным давлением поступала на форсунки вращающегося диспергатора. В результате центробежного разбрызгивания дисперсной системы формировались капли гелеподобной фазы. Устанавливая скорость вращения диспергатора 900,0; 1200,0; 1600,0; 2000,0 об/мин. формировали капли, которые попадали на внутренние стенки конического гранулятора. С увеличением скорости вращения диспергатора их размер уменьшался.

Третья стадия формирования микрокапсул состояла в обработке полученных капель дисперсной системы 4,0 % раствором хлористого кальция для образования водонерастворимого альгината кальция и формирования оболочек микрокапсул. Для этого раствор хлористого кальция подавался под заданным давлением на форсунки, расположенные по периметру верхней части гранулятора. Поток коагулянта они смывались в отверстие узкой части конуса гранулятора и попадали на вращающееся круглое сито для промывки (рисунок 2.2).

На данном последнем этапе происходила промывка микрокапсул стерильной водой. Вода для промывки поступала под заданным давлением на форсунки и удалялась через сетку вращающегося сита (рисунок 2.2). Готовые микрокапсулы собирались в приемник и переносились в емкость из лавсановой ткани для удаления воды и в таком виде передавались на следующую технологическую операцию. Полученные гидратированные капсулы замораживали при температуре минус 39,0–40,0 °С в течение 72 ч (TEFCOLD, Выборг, Дания). Последующую сушку проводили в течение 27-30 ч в защищенной от света камере сублимационной сушилки ВК-FD10PT (Biobase, Китай) при среднем рабочем давлении в сушильной камере 80,0–90,0 Па, температуре в конденсаторе – 48,0–49,0 °С. Сублимированные капсулы хранили при 4,0 °С.

Далее проводился анализ гидратированных и сублимированных микрокапсул. В качестве анализируемых параметров использовались морфология, размеры, количество капсул и содержание в них жизнеспособных клеток.

Анализ указанных выше параметров (таблица 3.1) выявил существенные корреляционные зависимости между технологическими параметрами процесса производства микрокапсул. Увеличение частоты вращения диспергатора с 900,0 до 2000,0 об/мин. приводит к увеличению продолжительности технологического процесса, необходимого для микрокапсулирования 2 литров дисперсной системы, в 1,8 раза. Одновременно это ускорение приводит к уменьшению массы полученных гидратированных микрокапсул в 1,3 раза. Причина этого явления заключается в том, что при увеличении скорости вращения диспергатора значительная часть дисперсной системы остается в контуре капсулятора и не участвует в процессе производства микрокапсул [145]. Этот факт обусловлен специфическими конструктивными особенностями автоматизированного инкапсулятора ИИ 0.35-1.5.

Таблица 3.1 – Параметры микрокапсул с *Lpb. plantarum*, полученных при различной скорости вращения привода диспергатора и постоянной частоте насоса подачи смеси 24,5 Гц

Параметры капсул	Скорость вращения привода диспергатора, об/мин.			
	900,0	1200,0	1600,0	2000,0
Время получения микрокапсул, мин.	100	125	130	180
Вес полученных гидратированных микрокапсул, г	553,6±28	573,8±29	455,9±23	423,0±21
Потери дисперсной системы, мл	280±14	350±18	475±24	550±28
Производительность капсулирования, г/мин.	5,53	4,59	3,5	2,35
Средний размер гидратированных микрокапсул, мкм	805±41	725±36	547±27	304±15
Вес сублимированных микрокапсул, г	31,0±0,5	33,7±0,7	27,6±0,4	28,0±0,7
Средний размер сублимированных микрокапсул, мкм	400±20	375±18	250±12	200±10
Насыпная плотность сублимированных микрокапсул, кг/м ³	270,0±15	370,0±18	440,0±22	480,0±24

Результаты исследований подтвердили прямую корреляцию между скоростью диспергирования и распределением капсул по размерам. С увеличением скорости средний размер гидратированных микрокапсул

уменьшается на 37,8%, что свидетельствует о возможности контроля размеров микрокапсул за счет изменения технологических параметров. Необходимо отметить, что производительность системы снизилась с 5,53 г/мин. при 900 об/мин. до 2,35 г/мин. при 2000 об/мин. Такое значительное снижение производительности указывает на необходимость оптимизации процесса [146].

Полученные данные также свидетельствуют о значительных потерях дисперсной системы в процессе производства: по мере увеличения скорости потери возрастают с 280 до 550 мл на 2 литра исходного объема. Потери объясняются тем, что при более высоких скоростях вращения привода возрастает доля капсулируемой смеси, которая задерживается в системе и не участвует в образовании микрокапсул. Кроме того, исследование выявило закономерности в изменении насыпной плотности капсул. При уменьшении размера микрокапсул их насыпная плотность значительно возрастает, достигая $480,0 \pm 24$ кг/м³ для фракции с наименьшим размером. Вероятно, это связано с изменениями их морфологии. Эти результаты имеют большое значение для оптимизации процесса. Они свидетельствуют о том, что, хотя более высокие скорости позволяют производить капсулы меньшего размера, они снижают производительность и увеличивают потери. Исходя из желаемого размера капсул и требований к эффективности производства, требуется тщательный подбор технологических параметров.

Рисунок 3.3 иллюстрирует зависимость эффективности микрокапсулирования от скорости вращения привода диспергатора. Увеличение скорости вращения во время обработки хлоридом кальция приводит к значительному, а именно в 2,4 раза, снижению способности к инкапсулированию *Lpb. plantarum* в альгинат натрия. Это снижение может быть обусловлено несколькими физическими явлениями. Во-первых, при более высоких скоростях дисперсная система испытывает большее напряжение сдвига, что нарушает равномерное формирование микрокапсул [147].

Во-вторых, повышенная турбулентность приводит к увеличению доли смеси, удерживаемой в контуре инкапсулятора и, соответственно, не участвующей в формировании капсул [148].

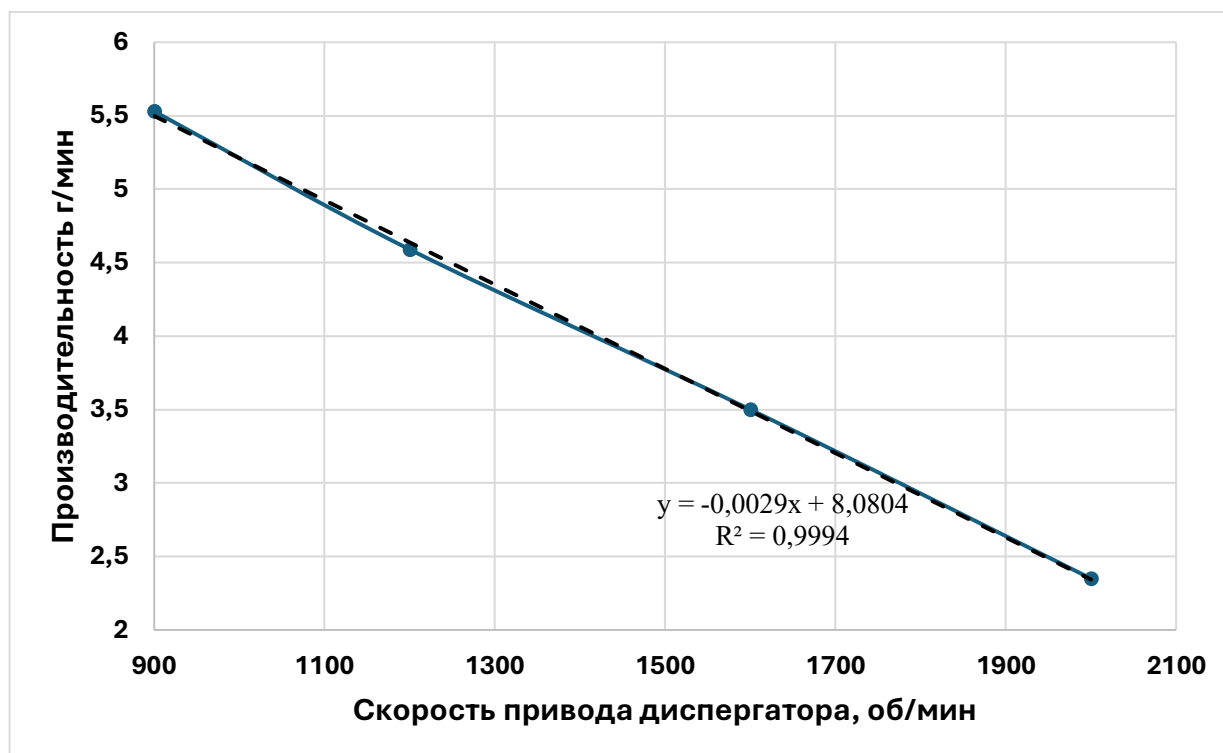


Рисунок 3.3 – Зависимость производительности капсулятора от скорости привода диспергатора

Примечательно, что постоянная частота подачи дисперсионной смеси, составляющая 24,5 Гц, играет решающую роль в этом процессе. В этих условиях скорость подачи диспергатора напрямую влияет на конечный размер микрокапсул. Как показано в таблице 3.1 и на рисунке 3.4, средний размер капсул уменьшается на 37,8% с увеличением скорости вращения привода.

Этот механизм уменьшения размера связан с физикой образования капель при центробежном распылении. Более высокие скорости приводят к образованию капель меньшего размера из-за увеличенной центробежной силы и меньшего времени пребывания капель в зоне гелеобразования. Этот эффект согласуется с принципами гидродинамики, управляющими образованием капель в процессах распыления [149].

Дальнейший анализ таблицы 3.1 показывает значительные различия в распределении микрокапсул по размерам, при этом отклонения от среднего значения составляют от 51 % до 58 % при различных скоростях привода диспергатора.

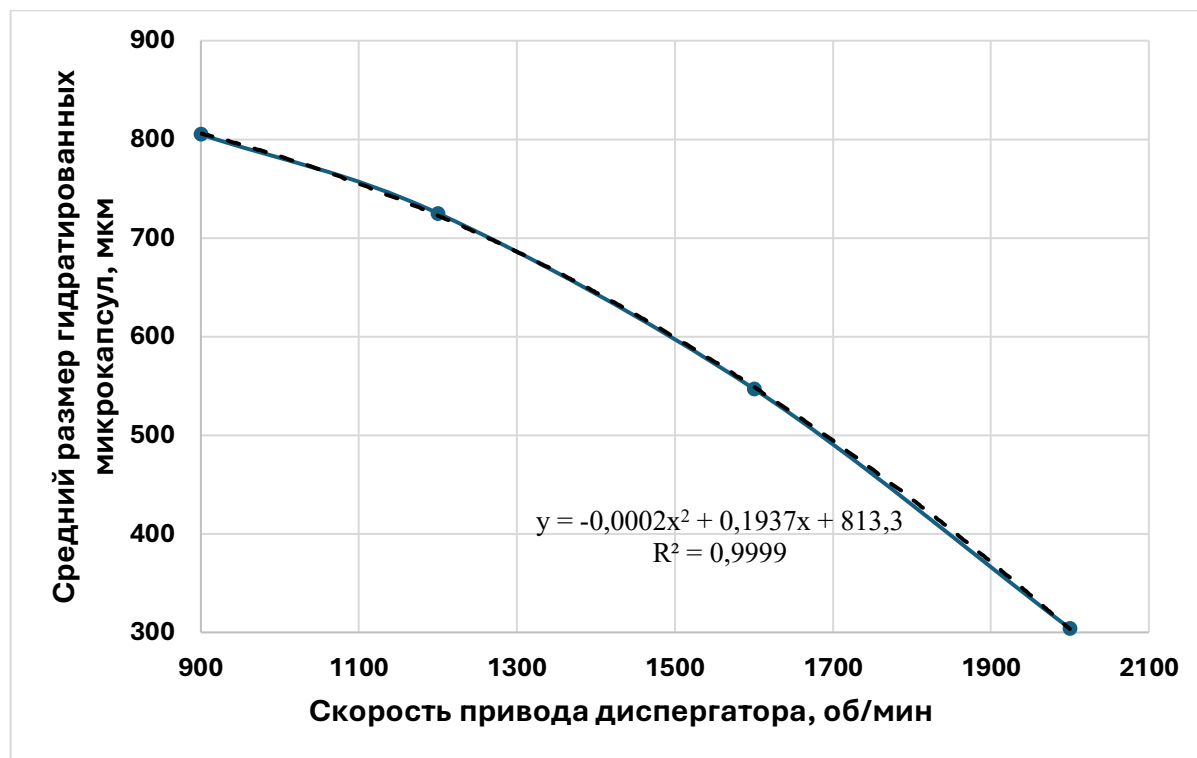


Рисунок 3.4 – Зависимость среднего размера гидратированных капсул от скорости привода диспергатора

Эти различия указывают на сложность процесса микрокапсулирования и влияние рабочих параметров на характеристики конечного продукта. Микроскопическое исследование с помощью световой микроскопии (рисунок 3.5) позволило оценить морфологические характеристики полученных микрокапсул. Гидратированные микрокапсулы имеют преимущественно округлую или овальную форму, с неровностями и углублениями на их поверхности. Эти дефекты поверхности могут влиять на общую структурную целостность и функциональность микрокапсул [150].

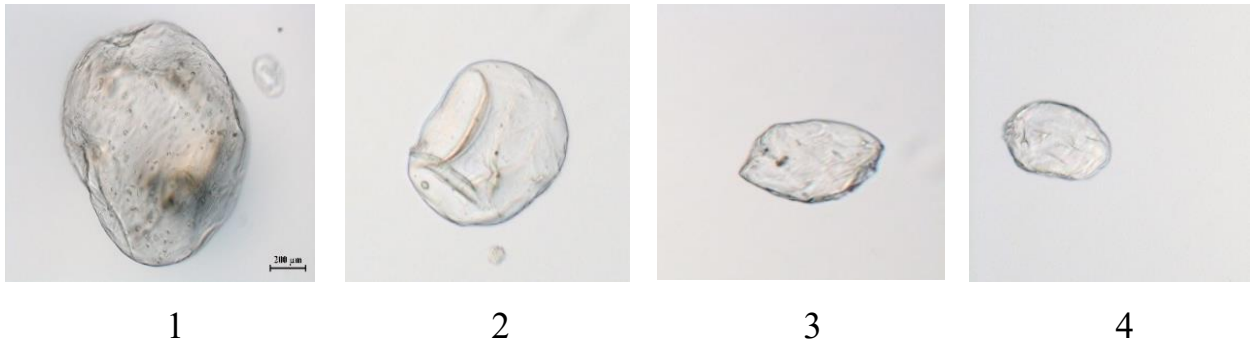


Рисунок 3.5 – Фотографии гидратированных микрокапсул средних размеров: 805 ± 41 мкм (1), 725 ± 36 мкм (2), 547 ± 27 мкм (3), 304 ± 15 мкм (4)

На рисунке 3.6 показана зависимость между средним размером сублимированных микрокапсул и скоростью подачи диспергатора. Эта зависимость имеет решающее значение для управления технологическим процессом и обеспечения качества продукции. Наблюдаемый механизм уменьшения размера может быть объяснен физикой сублимационной сушки, при которой потеря воды приводит к уменьшению объема и структурной перестройке альгинатной матрицы [151].

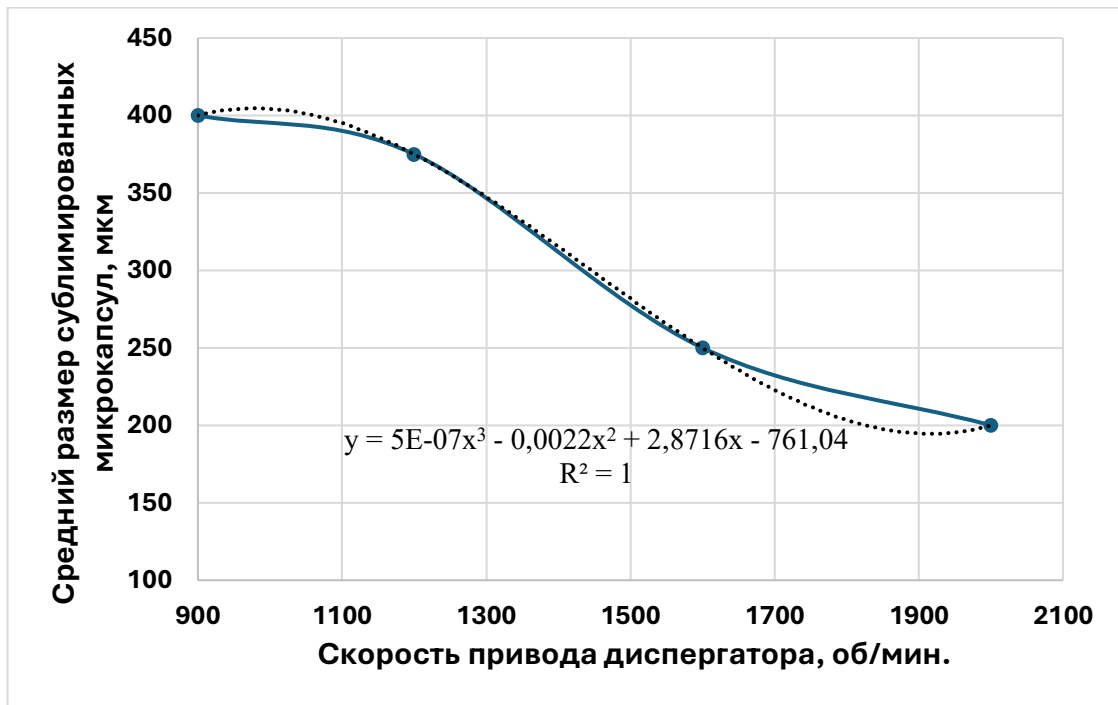


Рисунок 3.6 – Зависимость среднего размера сублимированных капсул от скорости привода диспергатора

Интересно, что переход от гидратированного к сублимированному состоянию приводит к уменьшению размера капсул более чем в два раза, как показано на рисунке 3.7 и подтверждено данными таблицы 3.1. Это значительное уменьшение размеров при сублимационной сушке является критическим фактором для практического применения, особенно в разработке лекарственных форм и систем доставки [152].

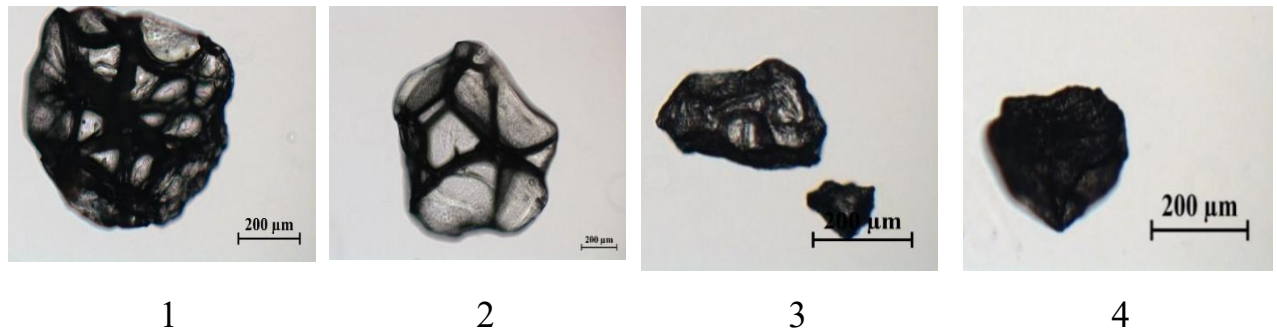


Рисунок 3.7 – Фотографии сублимированных микрокапсул средних размеров: 400 ± 20 мкм (1), 375 ± 18 мкм (2), 250 ± 12 мкм (3), 200 ± 10 мкм (4)

Подробный сравнительный анализ сублимированных микрокапсул показал четкие морфологические различия, зависящие от размера. Микрокапсулы размером 400 мкм имеют неправильную форму с крупными светлыми участками и ребристо-сетчатую структуру, дополненную относительно гладкими краями. Морфология постепенно изменяется по мере уменьшения размера капсул. Микрокапсулы размером 375 мкм имеют меньше светлых участков, а ребристая сетчатая структура располагается практически равномерно по всей их поверхности. Микрокапсулы размером 250 мкм характеризуются острыми зубчатыми краями, минимальной площадью светлой поверхности и выраженной ребристостью. У самых маленьких микрокапсул (200 мкм) наиболее выражены зубчатые края и полностью отсутствует гладкая поверхность. Важно отметить, что эти структурные изменения вызваны сокращением объема внутренней фазы при сублимационной сушке. Уменьшение площади поверхности оболочек микрокапсул и конденсация альгината кальция на их поверхности

играют решающую роль в формировании данных особенностей. Аналогичные наблюдения были также представлены в исследованиях [153-155]. Данные результаты согласуются с установленными принципами физики процесса сублимационной сушки, согласно которым уменьшение размера приводит к увеличению площади поверхности и изменению структурных характеристик [156].

Морфологические особенности, показанные на рисунках 3.5 и 3.7, можно объяснить взаимодействием между составляющими матрицы микрокапсул и кинетикой процесса сушки. Наличие неровностей и углублений на поверхности гидратированных микрокапсул указывает на потенциальные недостатки в структуре микрокапсул, которые могут повлиять на их общую целостность. Во время сублимационной сушки эти особенности поверхности становятся более выраженными из-за различной усадки и структурной перестройки альгинатной матрицы. Эти результаты имеют значение для оптимизации процесса и разработки продукта. Таким образом, высокие скорости позволяют производить микрокапсулы меньшего размера, однако снижают производительность и увеличивают потери дисперсионной среды.

Ключевыми параметрами, определяющими применимость микрокапсул в пищевой промышленности, являются их размер и количество [157]. Данные физические характеристики напрямую влияют на технологичность процесса, сохранность при хранении и функциональные свойства готового продукта [158]. Насыпная плотность, еще одно важное свойство, которое играет решающую роль при обработке, хранении и упаковке инкапсулированных микроорганизмов [159]. Взаимосвязь между распределением частиц по размерам, морфологией и насыпной плотностью особенно очевидна в сублимированных микрокапсулах. Исследование показало, что при уменьшении размера микрокапсул их насыпная плотность увеличивается до 1,8 раза. Такое увеличение объясняется двумя основными факторами: морфологическими изменениями, которые происходят во время сублимационной сушки, и более эффективной упаковкой мелких частиц, которая приводит к уменьшению расстояния между частицами [160].

3.2 Исследование влияния размера микрокапсул на жизнеспособность

Lpb. plantarum

Жизнеспособность инкапсулированных клеток *Lpb. plantarum* является важнейшим фактором, определяющим практическое применение микрокапсул в различных биотехнологических процессах и технологиях, связанных с пищевыми продуктами. В таблице 3.2 представлены данные о распределении жизнеспособных клеток в микрокапсулах различного размера, что указывает на взаимосвязь между размером микрокапсул и выживаемостью бактерий. Анализ полученных данных показал следующую закономерность: сублимированные микрокапсулы наибольшего размера (400 ± 20) мкм демонстрируют самую высокую концентрацию жизнеспособных клеток, их количество составляет $2,4 \times 10^8$ КОЕ/грамм. Наоборот, значительное уменьшение размера микрокапсул до (200 ± 10) мкм приводит к 30-кратному снижению содержания жизнеспособных клеток, достигая $0,8 \times 10^7$ КОЕ/г. Это существенное снижение количества жизнеспособных клеток при уменьшении размера микрокапсул можно объяснить тем, что микрокапсулы меньшего размера обладают значительно сниженным объемом внутренней фазы, что непосредственно влияет на количество инкапсулированных бактерий [161, 162]. Следовательно, в микрокапсулах меньшего размера бактерии могут быть подвержены наибольшему стрессу в процессе производства.

Полученные данные также указывают на интересные закономерности в распределении клеток по отдельным микрокапсулам. Более крупные микрокапсулы размером 400 мкм содержат приблизительно $1,3 \times 10^4$ КОЕ на микрокапсулу, в то время как самые маленькие микрокапсулы размером 200 мкм содержат всего 5,9 КОЕ на микрокапсулу, что значительно снижает бактериальную нагрузку на уровне отдельных микрокапсул.

Таблица 3.2 – Влияние размера микрокапсул с *Lpb. plantarum* на жизнеспособность лактобактерий ($p \leq 0,05$)

Параметры капсул	Средний размер сублимированных микрокапсул с <i>Lpb. plantarum</i> , мкм (световая микроскопия)			
	400±20	375±18	250±12	200±10
Количество сублимированных микрокапсул, шт/г	18,000	488,000	922,000	1,356,000
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/г	$2,4 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$0,8 \times 10^7$
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/1 капсула	$1,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	5,9
Жизнеспособность капсулированных лактобактерий после 300 дней хранения при 5 °С				
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/г	$1,95 \times 10^8$	$2,35 \times 10^7$	$1,85 \times 10^7$	$0,65 \times 10^7$
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/1 капсула	$1,08 \times 10^4$	$0,48 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$	4,79

Однако, несмотря на это значительное снижение, практическая применимость микрокапсул остается неизменной. Согласно промышленным стандартам, для обеспечения эффективности пробиотиков требуется минимум 10^6 КОЕ на дозу [163]. Учитывая высокое количество микрокапсул на грамм (от 18 000 до 1 356 000 микрокапсул/г), ежедневное употребление 1 г микрокапсул любого размера позволяет получить необходимое количество *Lpb. plantarum* в качестве пробиотика. Анализ стабильности при длительном хранении показывает, что после 300 дней хранения при температуре 5°С жизнеспособность, капсулированного *Lpb. plantarum* остается относительно стабильной, при этом количество КОЕ снижается незначительно. Это указывает на эффективность процесса инкапсуляции для защиты бактерий при длительном хранении [164]. Однако значительное уменьшение количества жизнеспособных лактобактерий в микрокапсулах по мере уменьшения их размера приводит к появлению вопросов об основных механизмах, влияющих на выживание бактерий.

На жизнеспособность инкапсулированных клеток влияет множество взаимосвязанных факторов на протяжении всего производственного процесса. Прежде всего, решающую роль играет физико-химическая природа самого процесса инкапсуляции. По мере уменьшения размера микрокапсул объем их

внутренней фазы, содержащей *Lpb. plantarum*, уменьшается, что непосредственно влияет на количество жизнеспособных клеток, которые могут быть заключены внутри них [165]. Это уменьшение объема усугубляется изменением физико-химических свойств оболочек микрокапсул во время сублимационной сушки. В то же время характеристики проницаемости оболочек микрокапсул имеют решающее значение для жизнеспособности бактерий. Микрокапсулы меньшего размера обладают измененными свойствами гидратации и сниженным проникновением необходимых газов и питательных веществ, необходимых для выживания бактерий [166]. Это ограничение может создать стрессовые условия для инкапсулированных клеток, потенциально приводя к нарушению обмена веществ [167]. В процессе инкапсуляции вступает в действие еще один критический фактор. Хлорид кальция, необходимый для образования микрокапсул, может взаимодействовать с клеточными стенками *Lpb. plantarum*. Это взаимодействие вызывает стрессовые реакции у бактерий, запуская адаптивные реакции, которые могут поставить под угрозу их жизнеспособность. Связывание ионов кальция с тейхоевой кислотой в клеточных стенках может нарушить нормальные клеточные функции [168].

Процесс сублимационной сушки приводит к дополнительным стрессовым факторам. Воздействие низких температур во время сублимационной сушки приводит к образованию кристаллов льда внутри микрокапсул. Эти кристаллы льда могут физически повреждать клеточные структуры и нарушать целостность клеток [169, 170]. Кроме того, процесс дегидратации изменяет свойства поверхности оболочек микрокапсул, создавая пористую структуру, которая может нарушить их защитную функцию [171]. Взаимосвязь между размером микрокапсул и жизнеспособностью бактерий также можно объяснить изменением соотношения альгината и кальция в оболочках капсул. Капсулы меньшего размера, как правило, имеют более высокое содержание кальция по сравнению с количеством альгината, что может повлиять на механические свойства оболочки и ее способность защищать содержащиеся в ней бактерии [172]. Важно отметить, что связывание кальция с клеточными стенками напрямую не снижает

жизнеспособность в нормальных условиях, однако совместное воздействие множества стрессовых факторов во время инкапсуляции оказывает совокупное воздействие на выживаемость бактерий. Следовательно, уменьшенный внутренний объем микрокапсул меньшего размера в сочетании с нарушенным массообменом и физическим напряжением во время обработки, скорее всего, в совокупности способствуют наблюдаемому снижению количества жизнеспособных клеток [173].

Таким образом, капсулы большего размера предпочтительнее для применения при необходимости обеспечения высокой бактериальной нагрузки, в то время как капсулы меньшего размера более пригодны в случаях, когда важен точный контроль дозировки. Наблюдаемые закономерности могут помочь в выборе оптимального размера капсул для конкретного применения, подтверждая возможность использования микрокапсул в качестве системы включения пробиотиков в функциональные пищевые продукты.

3.3 Изучение физико-химических свойств микрокапсул в зависимости от их размера

Объем полезной фазы, содержащей *Lpb. plantarum* и культуральную среду напрямую зависит от конечного размера гидратированных микрокапсул. Эта взаимосвязь является основополагающей для понимания процесса инкапсуляции в целом и его влияния на характеристики конечного продукта. Объем внутренней фазы в микрокапсулах значительно варьируется в зависимости от их размера, что напрямую влияет на количество жизнеспособных бактерий, которые могут быть инкапсулированы. Микрокапсулы малого размера по своей природе содержат меньший объем внутренней фазы, что приводит к уменьшению емкости для

размещения клеток *Lpb. plantarum* и компонентов культуральной среды [174]. Физико-химические свойства оболочек микрокапсул (характеристики проницаемости, способность к гидратации, структурная целостность, механическая прочность) также играют решающую роль в определении жизнеспособности инкапсулированных лактобактерий [175]. Все эти факторы в совокупности влияют на способность микрокапсул защищать и поддерживать жизнеспособность инкапсулированных бактерий на протяжении всего процесса производства и последующего хранения.

3.3.1 Измерение объема внутренней фазы микрокапсул

В процессе микрокапсулирования важным этапом является формирование внешней стенки капсулы, которая заключает в себе полезную нагрузку, содержащую питательную среду и воду. Объем полезной фазы напрямую зависит от конечного размера полученных микрокапсул, что, в свою очередь, влияет на распределение и концентрацию инкапсулированных лактобактерий [157]. Для определения объема внутренней фазы в микрокапсулах был использован контролируемый процесс замораживания. Гидратированные микрокапсулы подвергали замораживанию при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов, в течение которых вода внутри микрокапсул переходила в кристаллическую фазу. Образование кристаллов льда приводило к разрушению оболочек капсул. При размораживании при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ полезная фаза высвобождалась через разрывы, что приводило к заметному уменьшению объема капсулы, как показано на рисунке 3.8. Этот метод позволил точно измерить объем внутренней фазы в микрокапсулах разного размера. Процесс показал, что объем полезной фазы значительно варьировался в зависимости от размера микрокапсул, что

непосредственно влияло на количество инкапсулированных лактобактерий и компонентов культуральной среды.

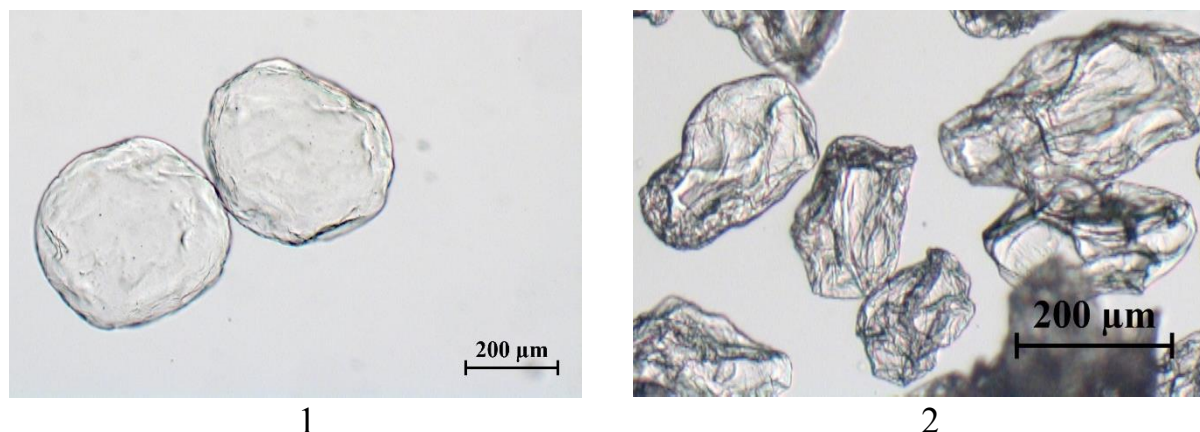


Рисунок 3.8 – Фотографии гидратированных микрокапсул среднего размера 725 ± 36 мкм (1) до замораживания и после выхода внутренней фазы (2)

Наблюдаемые изменения объема микрокапсул в процессе замораживания-оттаивания дают ценную информацию о структурной целостности и стабильности микрокапсул. Способность оболочки капсулы сохранять свою целостность во время фазовых переходов имеет решающее значение для сохранения жизнеспособности и распространения инкапсулированных бактерий [176]. Кроме того, взаимосвязь между размером микрокапсул и объемом внутренней фазы имеет большое значение в оптимизации процесса инкапсуляции для достижения желаемой бактериальной нагрузки и распределения. Понимание этих характеристик, связанных с объемом, необходимо для разработки эффективных стратегий микрокапсулирования, которые позволяют сбалансировать полезную нагрузку с требованиями к размеру капсулы для конкретного применения. Поэтому для измерения размеров капсул как до, так и после процесса замораживания было использовано динамическое рассеяние света. Методика включала расчет среднего объема капсул с гидратированным продуктом до и после размораживания. Разница между этими объемами позволила точно измерить объем внутренней фазы, содержащей полезную нагрузку, включающую лактобактерии, как показано в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Размеры микрокапсул до и после замораживания и расчет объема их внутренней фазы

Параметры	Средний размер гидратированных микрокапсул, мкм		
	725±36	547±27	304±15
Средний размер капсул после замораживания, мкм	52,7	64,2	80,2
Средний объем гидратированной капсулы, мл	$2,0 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$	$0,1 \times 10^{-4}$
Средний объем капсулы после замораживания, мл	$0,7 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$
Объем внутренней фазы, мл	$19,0 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$0,9 \times 10^{-5}$

Результаты эксперимента показали уменьшение объема внутренней фазы примерно в 21 раз по мере уменьшения размера микрокапсул. Однако, что интересно, количество жизнеспособных клеток уменьшилось всего в 5 раз, что указывает на сложную взаимосвязь между физическим объемом и жизнеспособностью бактерий. Это значительное несоответствие между уменьшением объема и уменьшением количества клеток позволяет предположить, что на выживаемость бактерий влияют не только изменения объема [177]. Возможные способствующие факторы могут включать различные реакции на стресс в микрокапсулах меньшего размера, различное распределение питательных веществ в меньших объемах, изменения в эффективности массообмена, измененные условия микросреды [178, 179].

3.3.2 Особенности строения оболочек микрокапсул в зависимости от их размера

Скорость получения микрокапсул существенно влияет на их физико-химические характеристики, в частности на состав и свойства их оболочек из альгината кальция [144]. В процессе инкапсуляции образуются микрокапсулы разного размера в зависимости от скорости подачи диспергатора. Как показано в таблице 3.1, снижение скорости получения микрокапсул в 2,35 раза увеличивает время контакта гидратированных микрокапсул с раствором хлорида кальция. Такое длительное время взаимодействия напрямую влияет на соотношение альгината и кальция в оболочках микрокапсул, что, в свою очередь, определяет термостабильность, устойчивость к перевариванию в желудочно-кишечном тракте, сохранение жизнеспособности *Lactiplantibacillus plantarum* при длительном хранении [154].

Механизм образования оболочек из альгината кальция основан на взаимодействии ионов Ca^{2+} и Cl^- с мономерами альгината натрия. Каждый мономер альгината натрия содержит две COO^- группы, которые взаимодействуют с ионами Ca^{2+} , превращая растворимый полисахарид в нерастворимый альгинат кальция. При более высоких концентрациях Ca^{2+} многочисленные молекулы альгината могут взаимодействовать с ионами Ca^{2+} , создавая на поверхности микрокапсулы сетчатую структуру с поперечными связями [180]. Для оценки стабильности этого механизма сшивки было изучено влияние раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) концентрацией 0,1 моль/л. ЭДТА действует как хелатирующий агент, способный связывать ионы Ca^{2+} из оболочек микрокапсул (рисунок 3.9). В сублимированных микрокапсулах это взаимодействие разрушает кальциевую сшивающую сеть, что приводит к повышенной растворимости альгината и повышенной водопроницаемости оболочек микрокапсул [181]. Следовательно, добавление ЭДТА к водной

суспензии микрокапсул вызывает набухание и расширение ранее не набухавших сублимированных микрокапсул.

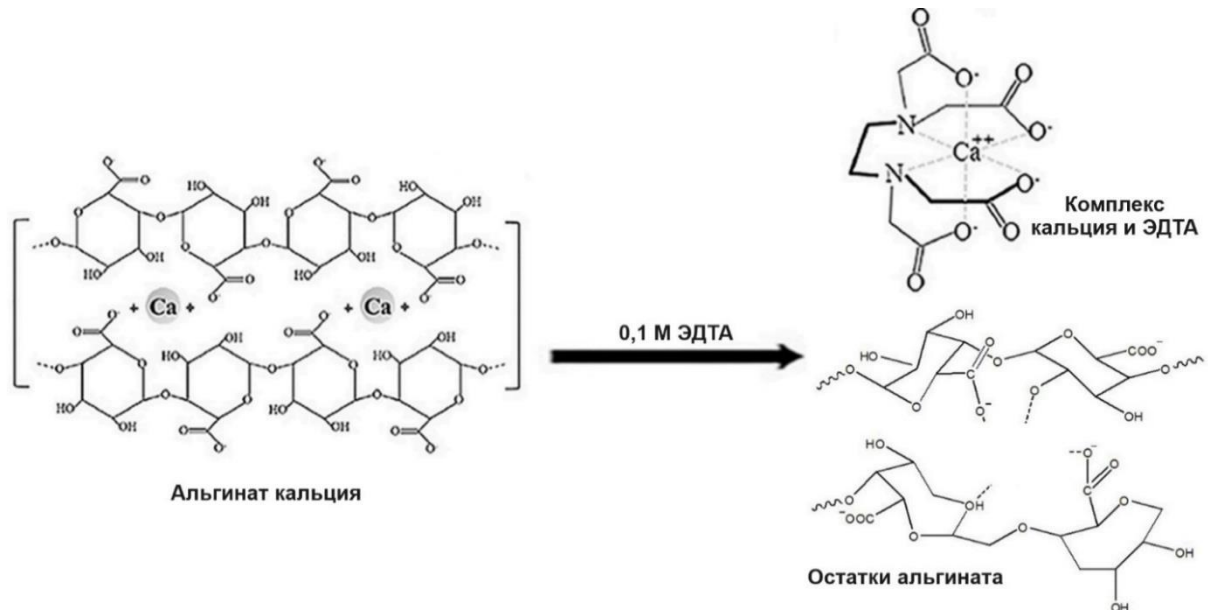


Рисунок 3.9 – Механизм разрушения оболочек микрокапсул из альгината кальция раствором ЭДТА

На рисунке 3.10 представлено визуальное подтверждение реакции микрокапсул на удаление кальция из их оболочек с использованием раствора ЭДТА в концентрации 0,1 моль/л. Микрофотографии демонстрируют, что размер микрокапсул увеличивается в 4-5 раз при увеличении количества добавленного раствора ЭДТА. При полном удалении ионов Ca^{2+} из оболочки микрокапсулы нарушается структурная целостность, что приводит к ее разрушению. Объем 0,1 моль/л ЭДТА, необходимый для разрушения оболочек микрокапсул использовали для определения количества функциональных альгинатных групп, участвующих в поддержании инкапсулированной структуры.

В таблице 3.4 приведены данные, указывающие на то, что при уменьшении размера микрокапсул объем раствора 0,1 моль/л ЭДТА, необходимый для разрушения, увеличивается в 1,4 раза. Это наблюдение напрямую коррелирует с увеличением содержания кальция в оболочках микрокапсул по мере уменьшения их размера [182].

А – Влияние 0,1 М ЭДТА на сублимированные микрокапсулы 400 ± 20 мкм

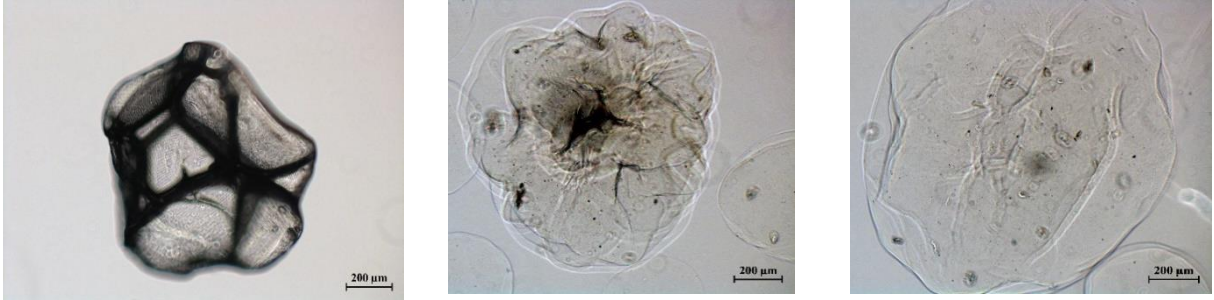


исходный

20 мин.

40 мин.

Б – Влияние 0,1 М ЭДТА на сублимированные микрокапсулы 375 ± 18 мкм



исходный

20 мин.

40 мин.

В – Влияние 0,1 М ЭДТА на сублимированные микрокапсулы 250 ± 12 мкм

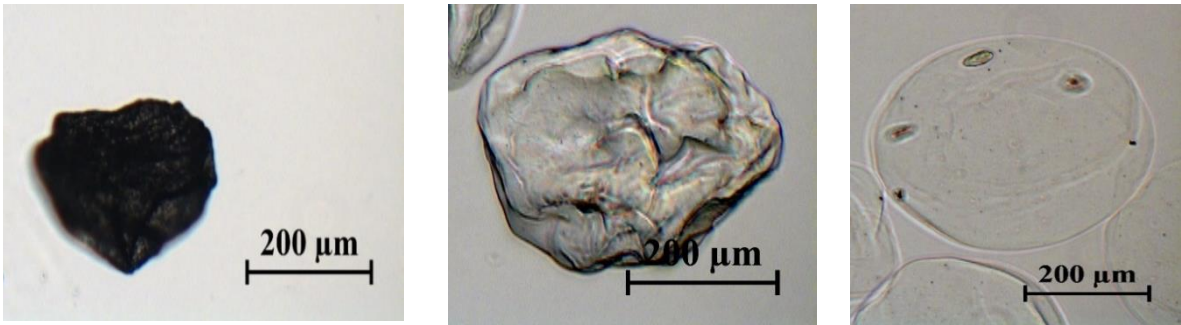


исходный

20 мин.

40 мин.

Г – Влияние 0,1 М ЭДТА на сублимированные микрокапсулы 200 ± 10 мкм



исходный

20 мин.

40 мин.

Рисунок 3.10 – Фотографии гидратирования сублимированных микрокапсул различных размеров: 400 ± 20 мкм (А), 375 ± 18 мкм (Б), 250 ± 12 мкм (В), 200 ± 10 мкм (Г) после 20 и 40 минут обработки 0,1 моль/л ЭДТА

Таблица 3.4 – Влияние 0,1 моль/л ЭДТА на сохранение оболочки микрокапсул, в зависимости от их размера

Показатель	Средний размер сублимированных микрокапсул с <i>Lpb. plantarum</i> , мкм			
	400±140	375±131	250±88	200±70
Масса навески микрокапсул, мг	100,8±5	101,3±5	104,0±5	100,0±5
Кол-во 0,1 моль/л ЭДТА на разрушение микрокапсул, мл	11±0,1	13±0,1	14,2±0,1	15,5±0,1
Кинематическая вязкость альгината после обработки капсул 0,1 моль/л ЭДТА, сСт	18,83±0,94	18,14±0,91	17,06±0,85	15,56±0,78
Количество кальция, необходимое для сохранения капсулированной формы, который удаляли 0,1 моль/л ЭДТА (моль×10 ⁻² /г капсул)	1,09×10 ⁻²	1,28×10 ⁻²	1,36×10 ⁻²	1,55×10 ⁻²
Количество карбоксильных групп альгината кальция, необходимые для сохранения капсулированной формы (моль/г капсул)	0,043	0,051	0,055	0,062
Количество кальция, г/г капсул	0,39±0,02	0,49±0,03	0,52±0,01	0,58±0,02
Количество альгината, г/г капсул	0,57±0,02	0,49±0,01	0,46±0,02	0,38±0,02

Механизм стабильности капсулирования определяется участием альгинатных СОО-групп в поддержании формы капсулированного продукта [183]. Экспериментальные данные показывают, что количество активных СОО-групп, участвующих в этом процессе, увеличивается в 1,5 раза при уменьшении размера микрокапсулы. Измерения вязкости в процессе обработки ЭДТА позволяют получить дополнительную информацию о структурной динамике. В частности, кинематическая вязкость раствора альгината снижается после обработки 0,1 моль/л ЭДТА. Это снижение вязкости объясняется увеличением объема раствора в результате набухания и нарушения структуры микрокапсул при хелатировании кальция [184].

Обнаружена интересная взаимосвязь между размером микрокапсул и их химическим составом, как показано на рисунках 3.11 и 3.12. При уменьшении размера микрокапсул содержание альгината в капсулах уменьшается, в то время как содержание кальция значительно увеличивается. Это явление напрямую

связано с рабочими параметрами процесса инкапсуляции. Согласно данным, представленным в таблице 3.1, увеличение скорости подачи диспергатора приводит к снижению производительности капсулятора. Снижение производительности приводит к более длительному воздействию на капли геля потока 5%-ного хлорида кальция. Следовательно, в формирующиеся микрокапсулы вводится более высокая концентрация ионов Ca^{2+} , о чем свидетельствует рисунок 3.11.

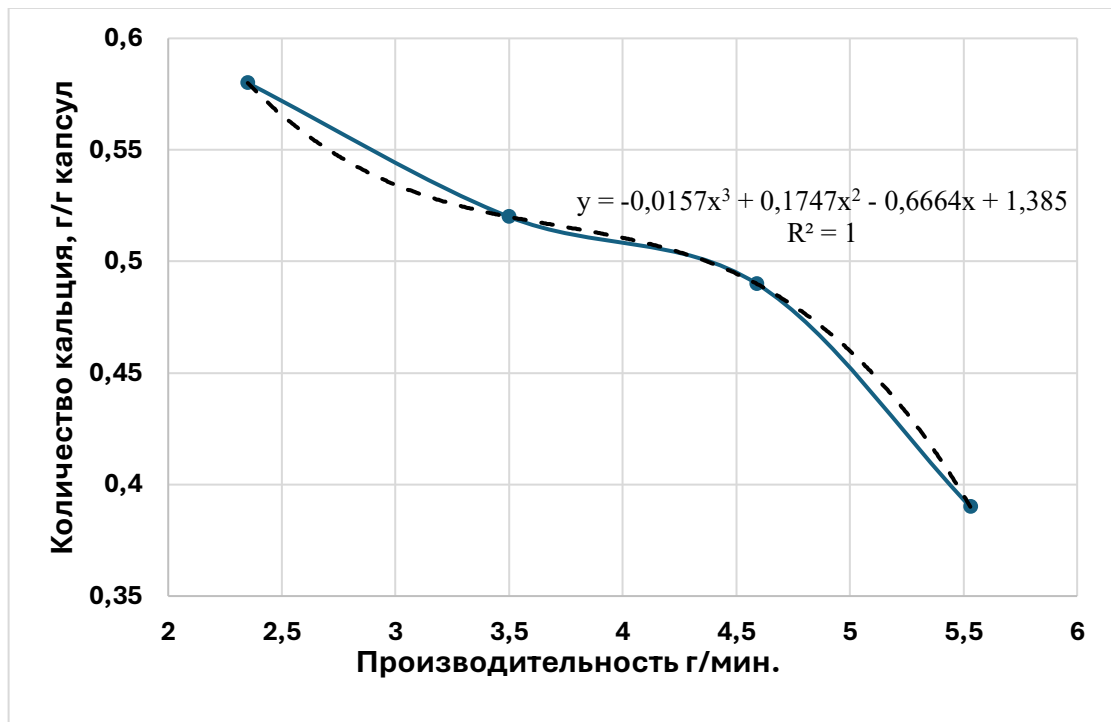


Рисунок 3.11 – Зависимость количества кальция в капсулах от производительности капсулятора

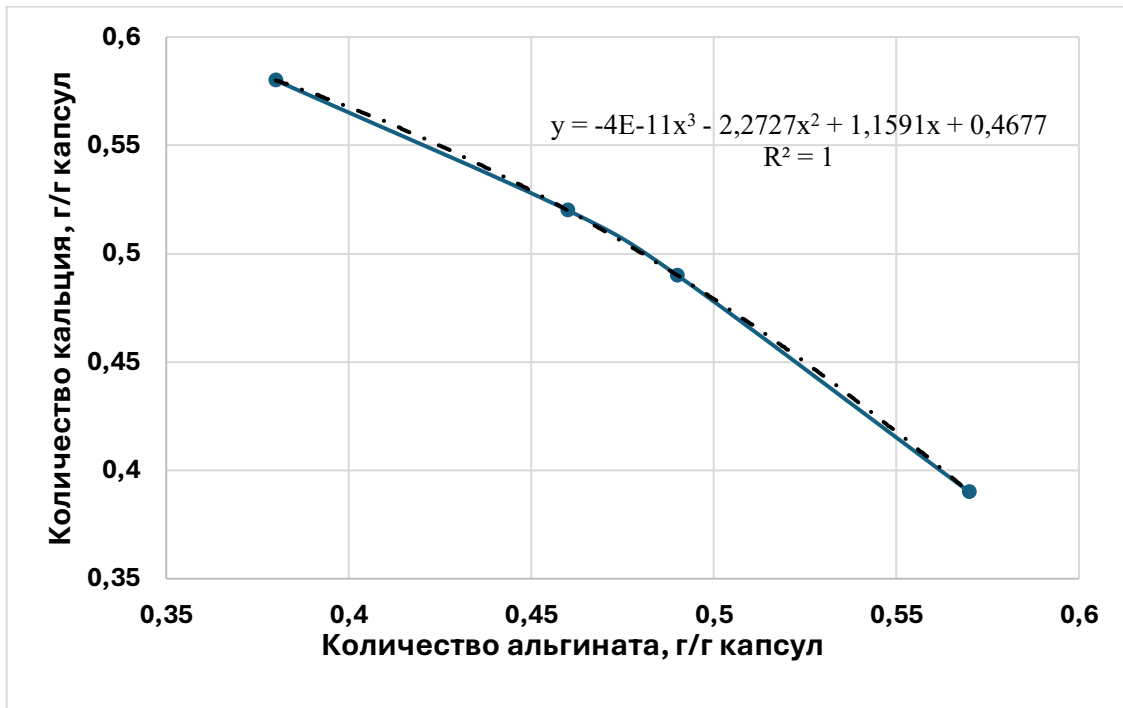


Рисунок 3.12 – Соотношение количества кальция в капсулах различного размера от количества альгината

Всесторонний анализ, представленный в таблице 3.4 и на рисунке 3.12, показывает четкую тенденцию: более крупные микрокапсулы содержат пропорционально больше кальция. Такое распределение кальция связано со структурой оболочки микрокапсул или с потенциальным взаимодействием со стенками клеток *Lpb. plantarum* [185]. Учитывая потенциальное влияние кальция на жизнеспособность бактерий посредством взаимодействия с тейхоевыми кислотами в клеточных стенках [186], было проведено детальное исследование оценки этого эффекта. Исследование проводилось в диапазоне концентраций раствора хлорида кальция 0,05–5,0 %. Бактерии инкубировали в контролируемых условиях при температуре 25°C в течение 4 ч, чтобы обеспечить достаточное время для любого потенциального взаимодействия между ионами Ca^{2+} и клеточными стенками бактерий.

Результаты этого эксперимента позволили получить информацию о взаимосвязи между концентрацией кальция и жизнеспособностью бактерий. В контрольном образце (без добавления хлорида кальция) количество КОЕ в популяции бактерий сохранялось на уровне $2,4 \times 10^{10}$ на г. При воздействии самой

низкой концентрации 0,05% хлорида кальция количество КОЕ незначительно уменьшилось до $1,7 \times 10^{10}$ на г. Когда концентрация хлорида кальция увеличилась до 0,5 %, количество КОЕ оставалось относительно стабильным на уровне $1,6 \times 10^{10}$ на г. Интересно, что даже при более высоких концентрациях хлорида кальция (1,0, 2,0 и 4,0%) жизнеспособность *Lpb. plantarum* оставалась стабильной, при этом количество КОЕ составляло $1,8 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^{10}$ и $2,1 \times 10^{10}$ на г, соответственно. Эти результаты (таблица 3.5) четко демонстрируют, что потенциальное взаимодействие между ионами Ca^{2+} и тейхоевой кислотой, присутствующей в клеточных стенках бактерий, не оказывает вредного влияния на общую жизнеспособность *Lpb. plantarum*.

Таблица 3.5 – Влияние различных концентраций хлористого кальция на жизнеспособность *Lpb. plantarum*

<i>Lpb. plantarum</i> КОЕ/г	Концентрация CaCl_2 , %					
	контроль	0,05	0,5	1,0	2,0	4,0
	$2,4 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^{10}$

В ходе изучения влияния состава микрокапсул на жизнеспособность бактерий был обнаружен интересный эффект. Несмотря на изменение соотношения альгината и кальция в оболочках микрокапсул по мере уменьшения их размера, это изменение не влияет на выживаемость инкапсулированных лактобактерий. В условиях эксперимента в оболочках микрокапсул происходят важные структурные изменения. Избыток ионов Ca^{2+} взаимодействует с многочисленными молекулами альгината, создавая сложную сетчатую структуру, которая повышает общую жесткость стенок капсулы. Это структурное усиление является результатом процесса сшивки между ионами Ca^{2+} и молекулами альгината, который формирует более стабильную сетку внутри оболочки [187].

Повышенная структурная жесткость оказывает существенное влияние на термическую стабильность микрокапсул. По мере уменьшения размера микрокапсул доля кальция в их оболочках увеличивается, что приводит к образованию более прочной поперечно-сшитой сети [188]. Следовательно, усиленная сшивка, вероятно, способствует повышению термостабильности, что

позволяет предположить, что микрокапсулы меньшего размера могут проявлять большую устойчивость к термическому разложению по сравнению с их более крупными аналогами.

3.3.3 Исследование влияния размера капсул на термостабильность

В процессе термического разложения биополимеров происходят значительные изменения в их внутреннем теплосодержании, которые проявляются либо как эндотермические (поглощение тепла), либо как экзотермические (выделение тепла) реакции [189]. Эти тепловые изменения могут быть эффективно обнаружены с помощью термогравиметрического метода анализа, который фиксирует изменения массы вещества по мере того, как оно теряет массу при контролируемом повышении температуры [138]. В случае микрокапсул с альгинатом кальция на термические характеристики влияет взаимодействие избытка ионов Ca^{2+} с молекулами альгината. Это взаимодействие формирует сетчатую структуру внутри оболочек капсул, способствуя их повышенной жесткости [179]. Образование этой поперечно-связанной сетки не только укрепляет физическую структуру микрокапсул, но и влияет на их тепловые свойства.

Исследование заключалось в характеристике стадий термического разложения альгината кальция с помощью разностороннего подхода. Проводили анализ трех ключевых кривых: кривой термогравиметрии (ТГ), которая показывает данные о потере массы в зависимости от температуры; кривой ДТГ (дифференциальной термогравиметрии), отражающей скорость изменения массы относительно температуры; кривой ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии), измеряющей изменения теплового потока при термическом

разложении [190-192]. Анализ кривых ТГ, ДТГ и ДСК (рисунок 3.13) показал, что термоокислительное разложение альгината кальция происходило в 3 различные стадии. Это разделение основано на наблюдаемых изменениях свойств карбонизированного полимера при различных температурных режимах и характере химических реакций, протекающих в определенных температурных диапазонах.

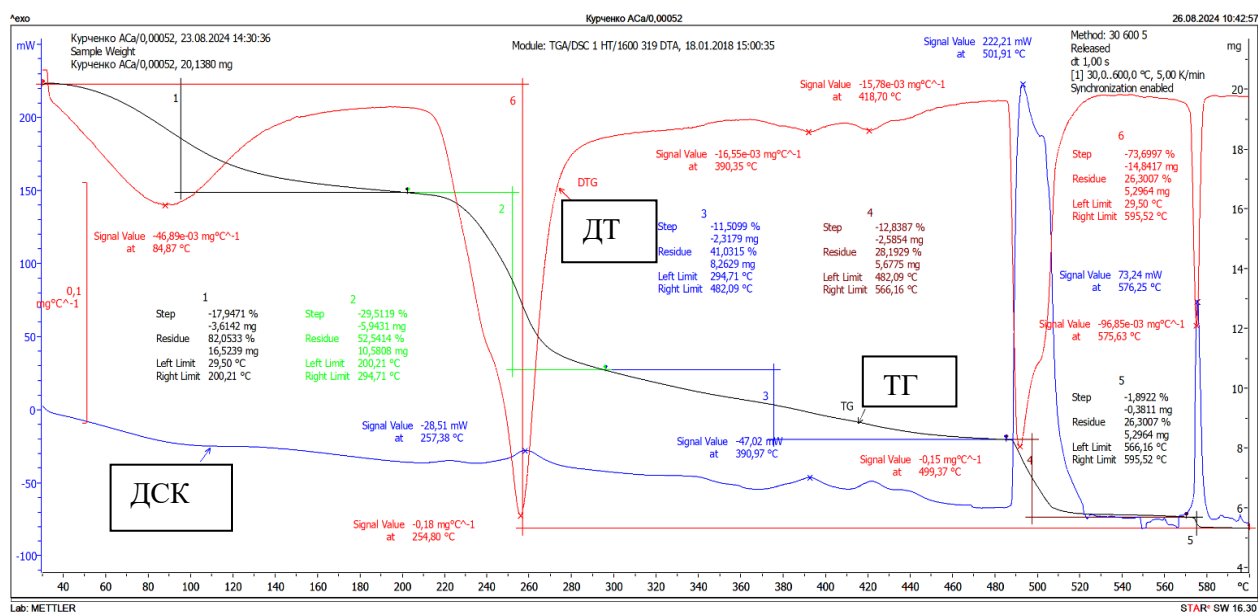


Рисунок 3.13 – Термогравиметрический анализ альгината кальция

Анализ кривой ДТГ показал четкий трехэтапный процесс разложения. Начальная стадия, протекающая при температуре от 25 °C до 180 °C, характеризуется заметной потерей массы, связанной с испарением воды из образца. Эта первая стадия закладывает основу для последующих термических превращений. Вторая стадия термического разложения протекает в узком температурном диапазоне 200-294 °C, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице 3.6. Эта стадия достигает своей максимальной скорости термической деструкции при температуре 254 °C, что указывает на критическую точку для структурного преобразования альгината кальция, которая близка к данным, представленным в недавних исследованиях [193, 194]. Вторая стадия термического разложения особенно интересна, поскольку она состоит из

двух отдельных фаз. Такое двухфазное поведение объясняется дифференциальным разложением компонентов микрокапсул.

Примечательно, что температурные диапазоны и пиковые значения термической деструкции для *Lpb. plantarum* значительно отличаются от значений для оболочки из альгината кальция. Поэтому важным аспектом данного исследования было изучение процесса термической деструкции *Lpb. plantarum*, который представляет собой внутреннюю фазу микрокапсул. Термическое разложение лактобактерий внутри микрокапсул протекает по уникальной схеме, как показано кривыми ДТГ и ДСК на рисунке 3.14.

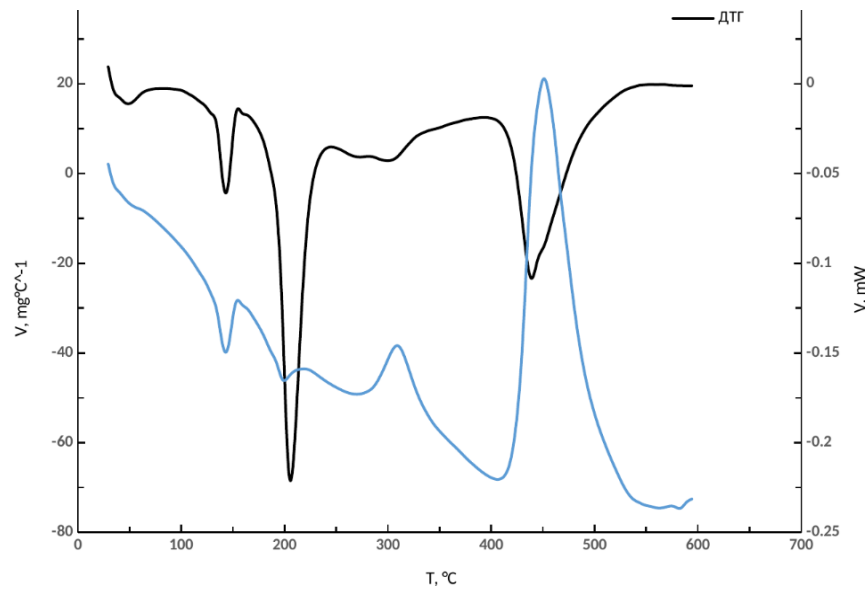


Рисунок 3.14 – Термогравиметрический анализ сублимированной культуры *Lpb. plantarum*

При температуре 100-250 °С начинается эндотермический процесс, связанный с плавлением ДНК и белков [195, 196]. Впоследствии он переходит в две экзотермические фазы, представляющие собой разложение бактериальных компонентов. Важно отметить, что эти температурные переходы не совпадают с пиками разложения, наблюдаемыми для оболочки из альгината кальция (рисунок 3.13).

Анализ термического разложения сублимированных микрокапсул, содержащих как альгинат кальция, так и *Lpb. plantarum*, позволяет получить информацию об их структурных и термических характеристиках. На основе анализа методом ДТГ и ДСК (рисунки 3.15 и 3.16), исследование выявило трехэтапный процесс пиролиза, общий для всех размеров микрокапсул. Первая стадия разложения характеризуется потерей массы, непосредственно связанной с испарением воды из структуры микрокапсул. Эта начальная фаза является основой для последующих термических преобразований путем удаления остаточной влаги из инкапсулированного материала. Последующие стадии термического разложения имеют более сложный характер. Параметры 2-й и 3-й стадий термоокислительной деструкции микрокапсул представлены в таблице 3.6.

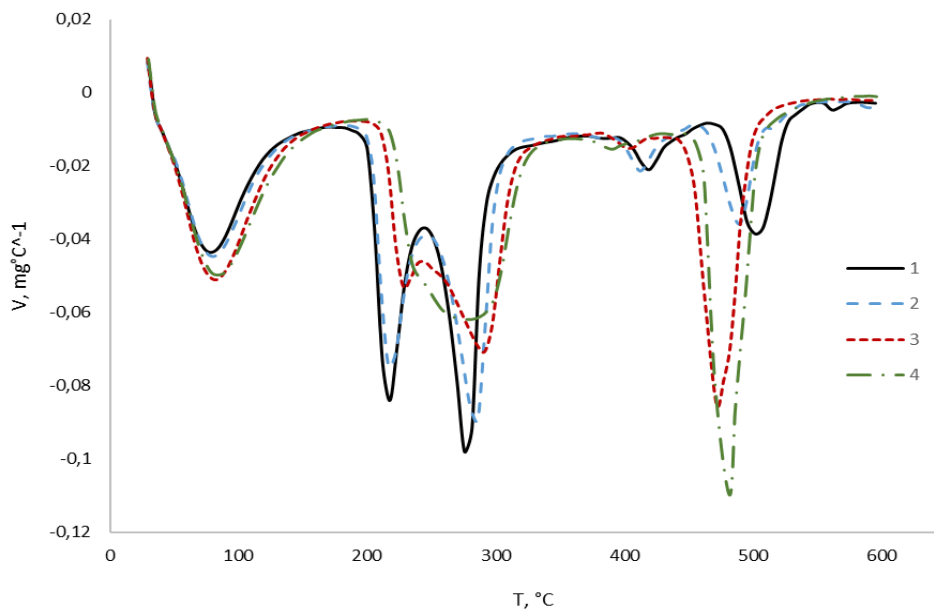


Рисунок 3.15 – Кривые дифференциальной термогравиметрии (ДТГ) сублимированных микрокапсул размером 400 ± 20 мкм (1), 375 ± 18 мкм (2), 250 ± 12 мкм (3), 200 ± 10 мкм (4)

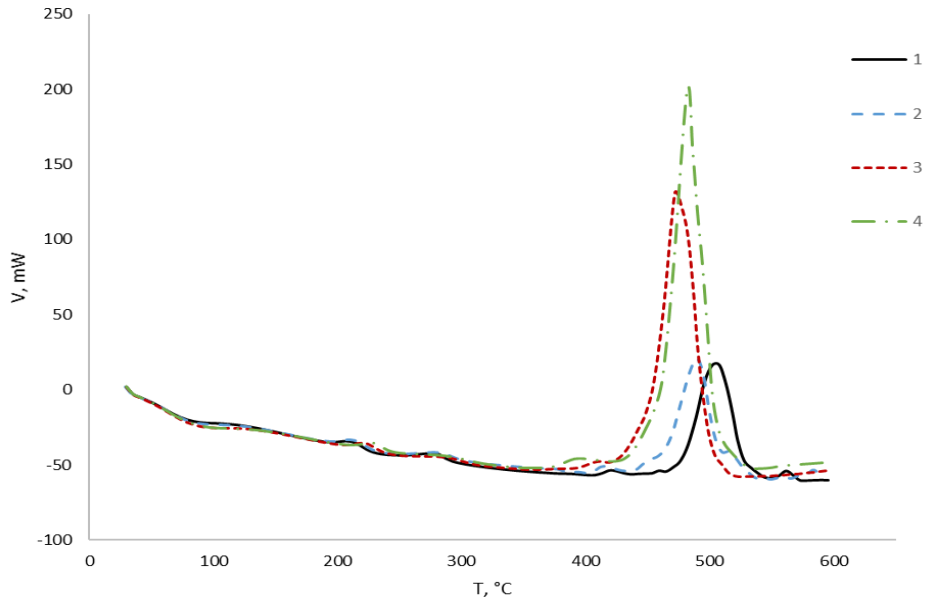


Рисунок 3.16 – Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) сублимированных микрокапсул размером 400 ± 20 мкм (1), 375 ± 18 мкм (2), 250 ± 12 мкм (3), 200 ± 10 мкм (4)

Вторая стадия состоит из двух отдельных фаз термического разложения, в которых участвуют оболочки микрокапсул. Эта стадия протекает в определенных температурных диапазонах и сопровождается различной скоростью выделения тепла. Интересно, что с уменьшением размера микрокапсул наблюдается несколько ключевых изменений: увеличение максимальной температуры тепловыделения, уменьшение высоты пиков кривой ДТГ и сдвиги в температурных диапазонах разложения. Эти изменения напрямую связаны с изменением состава оболочек микрокапсул. По мере уменьшения размера микрокапсул относительное количество альгината снижается, а содержание кальция увеличивается. Это изменение состава влияет как на термостабильность, так и на способность микрокапсул к разложению [197].

Таблица 3.6 – Основные характеристики термического разложения альгината кальция и микрокапсул различного размера с *Lpb. plantarum*

Образец	2 этап термического разложения (200–333 °С)				3 этап термического разложения (400–560 °С)	
	Интервал температур, °С	Максимум тепловыделения, °С	Потеря массы, %	Энергия активации (Ea), кДж/моль	Максимум тепловыделения, °С	Потеря массы, %
Альгинат кальция	200-294	254,2	29,5	48	499,4	12,9
Микрокапсулы 400±20 мкм	200-245	215,9	11,0	46	503,3	8,19
	245-309	278,0	16,3			
Микрокапсулы 375±18 мкм	200-248	218,2	11,5	49	490,3	7,3
	248-316	284,6	16,9			
Микрокапсулы 250±12 мкм	200-244	229,3	7,0	59	469,0	14,8
	244-327	294,1	19,6			
Микрокапсулы 200±10 мкм	200-333	274,7	26,5	113	477,2	16,7

На третьей стадии разложения наблюдается противоположная тенденция по сравнению со второй стадией. Здесь уменьшение размера микрокапсул приводит к снижению температуры пиролиза, переходя от более высоких к более низким температурным порогам. В то же время ДСК-анализ показывает увеличение тепловыделения при уменьшении размера микрокапсул. Такое поведение подтверждает значительную роль кальция во влиянии на структурную целостность и пути термического разложения оболочек микрокапсул на основе альгината [194].

Вторая стадия состоит из двух фаз термического разложения оболочек микрокапсул и протекает в интервалах температур 200-245 °С и 245-333 °С. Как видно из таблицы 3.6, во время первой и второй фаз этой стадии термического разложения микрокапсул наблюдается увеличение максимальной температуры выделения тепла при уменьшении их размера. Эти температурные сдвиги при разложении указывают на незначительные различия в составе оболочек микрокапсул. Кроме того, наблюдается уменьшение высоты пиков кривой ДТГ при уменьшении размера микрокапсул. Эти изменения обусловлены тем, что с уменьшением размера микрокапсул в их оболочках уменьшается содержание альгината и увеличивается количество кальция, как видно из таблицы 3.4. Различия в соотношении альгината и связанного с ним кальция, при уменьшении размера микрокапсул, зависят от особенностей технологии их производства. При изготовлении микрокапсул из альгината натрия полимер обрабатывают хлоридом кальция [198]. В результате образуется нерастворимый в воде альгинат кальция, который приводит к образованию оболочки микрокапсул.

На рисунке 3.17 показаны возможные механизмы образования оболочки микрокапсулы в зависимости от количества связанного альгината кальция. При увеличении концентрации ионов Ca^{2+} его избыток взаимодействует с несколькими молекулами полимера. Образование сетчатой структуры альгината кальция в процессе инкапсуляции создает прочную оболочку для микрокапсул. Это структурное преобразование сопровождается значительным увеличением количества карбоксильных групп, участвующих в образовании оболочки, которое

увеличивается в 1,5 раза по сравнению с исходным состоянием (таблица 3.4). Это усиленное взаимодействие между ионами Ca^{2+} и молекулами альгината обеспечивает повышенную термостабильность микрокапсул. Примечательно, что улучшенная термостойкость количественно подтверждается увеличением энергии активации (E_a) термоокислительной деструкции по мере уменьшения размера микрокапсул (таблица 3.6). Во время второй стадии происходят незначительные экзотермические процессы, связанные с дегидратацией полимера и образованием фрагментов с COO^- группами. В первую очередь они связаны с процессами дегидратации полимера, образованием фрагментов, содержащих карбонильные группы, перестройкой молекулярных структур [199].

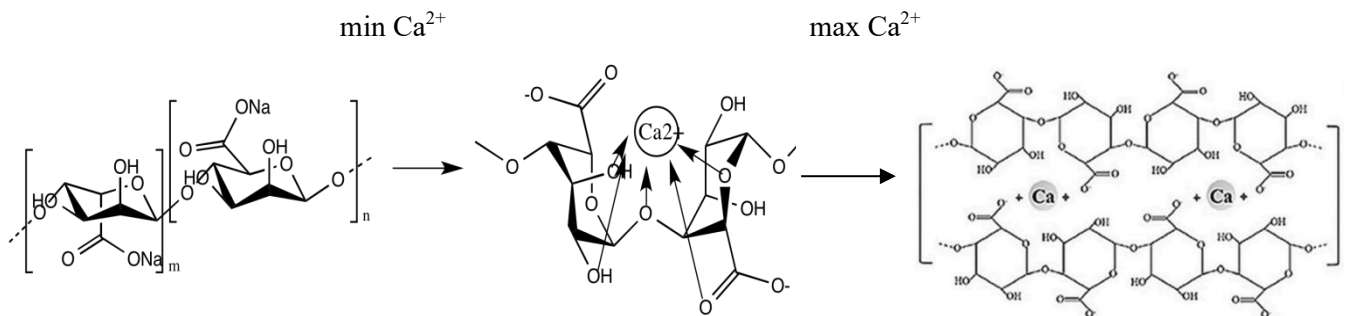


Рисунок 3.17 – Механизм связывания альгинатом ионов кальция в зависимости его количества

При сравнении второй и третьей стадий термического разложения наблюдается заметный контраст. Если на второй стадии температура пиролиза повышается при уменьшении размера микрокапсул, то на третьей стадии наблюдается противоположный эффект. По мере уменьшения размера микрокапсул температура пиролиза изменяется с $503\text{ }^\circ\text{C}$ до $477\text{ }^\circ\text{C}$, о чем свидетельствует анализ кривой ДТГ (рисунок 3.15). Интересно, что анализ кривых ДСК показывает увеличение тепловыделения при уменьшении размера микрокапсул на третьем этапе. Такое сложное поведение подчеркивает решающую роль кальция в механизмах разрушения оболочки и его влияние на термический распад связей С-С и С-О в структуре альгинатного мономера [200].

Всесторонний термогравиметрический анализ ясно показывает, что микрокапсулы меньшего размера обладают более высокой термической стабильностью из-за повышенного содержания в них кальция. Повышенная стабильность обусловлена образованием более плотной сетки внутри матрицы капсулы, обеспечивающей лучшую устойчивость к процессам термической деструкции. Этот вывод имеет важное практическое значение для разработки термостабильных систем инкапсуляции для доставки пробиотиков.

3.3.4 Изучение влияния размера микрокапсул на синтез биологически активных веществ микроинкапсулированными *Lpb. plantarum*

Получение гидратированных и сублимированных микрокапсул с *Lpb. plantarum* происходит в экстремальных физико-химических условиях, что вызывает стрессовые реакции у бактерий. Этот стресс запускает адаптивные реакции, которые регулируют синтез вторичных метаболитов [201; 202]. Для изучения этих метаболических изменений с помощью ГХ-МС были проанализированы состав и содержание биологически активных веществ в экстрактах из сублимированной культуры *Lpb. plantarum* и микрокапсул различных размеров (400 мкм, 375 мкм, 250 мкм и 200 мкм). Полученная типичная ГХ-МС хроматограмма показана на рисунке 3.18 (А). Спектроскопический анализ показал наличие более 18 циклических и алифатических соединений во всех образцах. Было установлено, что общее содержание циклических соединений имеет тенденцию к снижению с уменьшением размеров микрокапсул. Сублимированная культура *Lpb. plantarum* содержала 7,98 мкг/мл циклических соединений, в то время как микрокапсулы размером 400, 375, 250, 200 мкм содержали 8,23, 8,02, 7,65, 6,94 мкг/мл

соответственно. Значительная их часть представлена фенольными веществами, которые проявляют антиоксидантные свойства и влияют на вкусовые характеристики кисломолочных продуктов [203, 204]. Для алифатических соединений установлена более сложная закономерность. Содержание алифатических соединений заметно различалось в разных образцах: сублимированная *Lpb. plantarum* содержала 14,76 мкг/мл, в то время как микрокапсулы размером 400, 375, 250 и 200 мкм характеризовались концентрациями 7,16, 12,23, 15,3 и 12,03 мкг/мл соответственно. Наблюдаемые различия в составе и концентрации соединений при различных размерах капсул позволяют предположить, что процесс инкапсуляции влияет на метаболические пути *Lpb. plantarum*. Наибольшие различия наблюдались в алифатических соединениях, что указывает на то, что размер микрокапсул существенно влияет на метаболический профиль инкапсулированных бактерий. Для интерпретации результатов, полученных в результате ГХ-МС анализа, была разработана комплексная визуализация тепловой карты. Тепловая карта, представленная на рисунке 3.18 (В), иллюстрирует сложные взаимосвязи между составом и концентрацией химических соединений, присутствующих в экстрактах из *Lpb. plantarum* и микрокапсулах разного размера. Для визуализации используется система цветового кодирования, где синий цвет обозначает максимальные значения концентрации, а светло-голубой - минимальные или близкие к нулю концентрации. Структура тепловой карты упорядочивает химические соединения по строкам, а исследуемые образцы - по столбцам, обеспечивая четкое представление о распределении соединений в различных образцах.

Как видно из рисунка 3.18 (В), исследованные образцы можно разделить на пять основных подкластеров в зависимости от их химического состава и содержания. Экстракт из *Lpb. plantarum* сформировал два различных подкластера. Первый подкластер включал гексадекановую кислоту, метиловый эфир и 2,4-ди-трет-бутилфенол. Эти соединения постоянно присутствовали как в *Lpb. plantarum*, так и во всех микрокапсулах различного размера, что указывает на их фундаментальную роль в структуре бактерий. Второй подкластер

характеризовался повышенным содержанием метанола, (3,4-диметилфенил) (2,4,6-триметилфенил)- и уксусной кислоты, [(4-этоксифенил)амино]оксоэтилового эфира. Эти соединения были в избытке обнаружены в *Lpb. plantarum*, но присутствовали лишь в следовых количествах в микрокапсулах размером 375 и 250 мкм. Третий подкластер включал циклогексан, 1,1-диметил-2-пропил- и бензо[b]селенофен-2-карбонитрил, 3-(гидроксиметил)-. Эти вещества были найдены исключительно в микрокапсулах размером 400 и 375 мкм, что подчеркивает их уникальный химический состав. Четвертый подкластер включал биологически активные вещества, присутствующие в капсулах лишь в небольших количествах и отсутствующие в *Lpb. plantarum*. Заметными среди них были пропенон, 3-(2-бензоксазолитио)-1-фенил- и октадекановая кислоты. Пятый подкластер содержал вещества, имеющие особое значение для понимания адаптивных реакций *Lpb. plantarum* на процесс микрокапсулирования. К ним относятся *n*-(2-гидроксиэтил) этилендиаминтриуксусная кислота и *n*-гексадекановая кислота. Эти соединения были обнаружены в значительных количествах во всех образцах микрокапсул, но заметно отсутствовали в экстрактах *Lpb. plantarum*.

Выявленные различия в составе и содержании веществ в подкластерах свидетельствуют о влиянии физико-химических факторов на метаболизм лактобактерий в процессе производства микрокапсул. К таким факторам можно отнести особенности используемой технологии микрокапсулирования, а также условия сублимационной сушки микрокапсул. Во время сублимационной сушки образцы *Lpb. plantarum* и микрокапсулы подвергались одинаковому воздействию: замораживанию и испарению воды в вакууме. Анализ результатов показал радикальную разницу в составе вторичных метаболитов, входящих в состав микрокапсул, по сравнению с контрольным образцом *Lpb. plantarum*. Это свидетельствует о том, что процесс сублимационной сушки не повлиял на состав биологически активных веществ в исследуемых объектах.

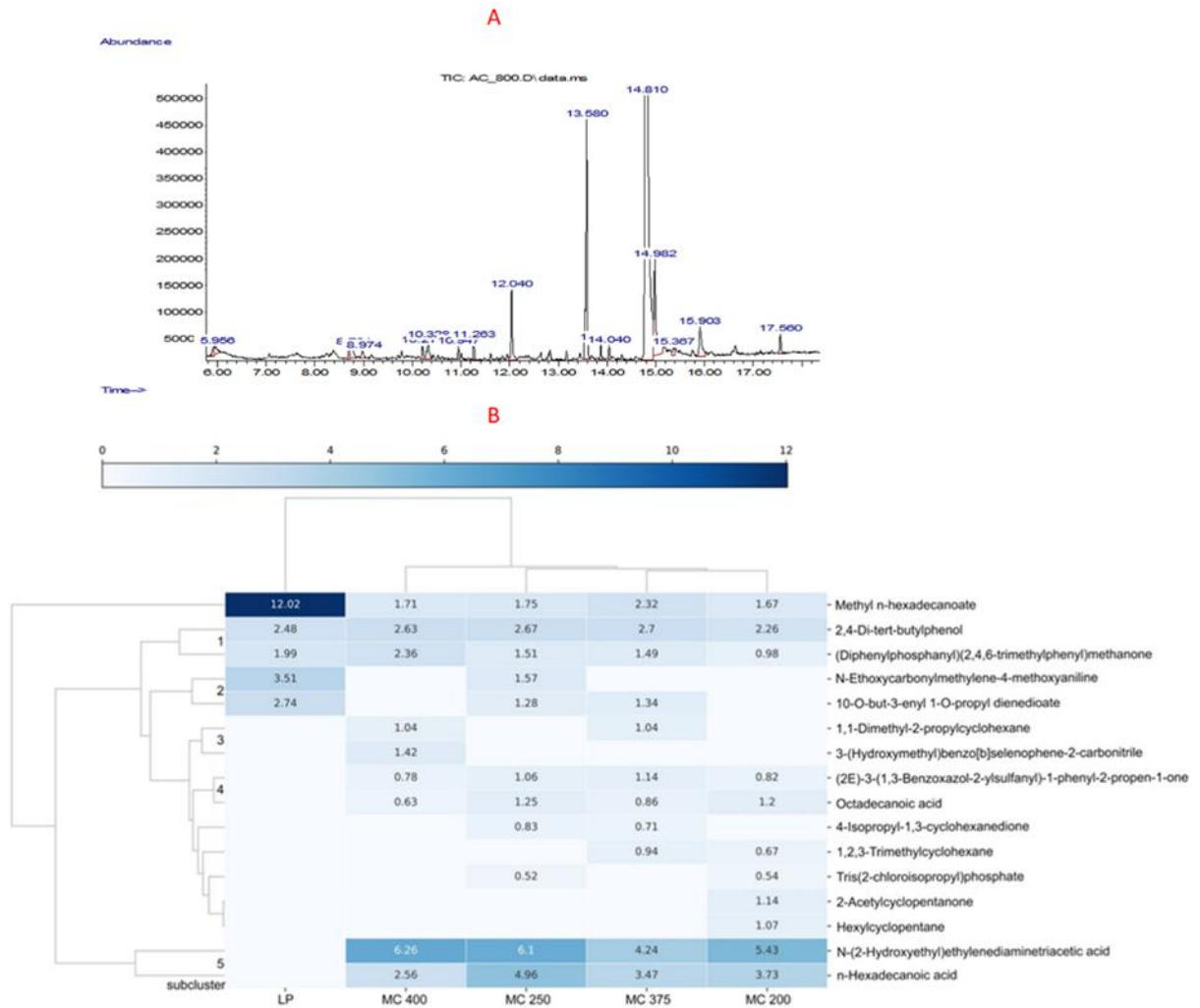


Рисунок 3.18 – Анализ содержания биологически активных веществ в микрокапсулах.

А: хроматографический профиль экстракта методом ГХ-МС, полученного из сублимированных микрокапсул со средним размером 400 ± 20 мкм.

В: тепловая карта состава и содержания основных вторичных метаболитов (мкг/мл) в ГХ-МС экстрактах из сублимированных микрокапсул со средним размером 400 ± 20 мкм, 375 ± 18 мкм, 250 ± 12 мкм и 200 ± 10 мкм.

На биохимический состав биологически активных веществ в микрокапсулах существенное влияние оказывают физико-химические факторы, присущие процессу микрокапсулирования. Эти факторы, особенно связанные с технологией производства и условиями сублимационной сушки, играют решающую роль в формировании конечного состава веществ в микрокапсулах. [147, 204]. В процессе инкапсуляции *Lpb. plantarum* подвергается воздействию различных

стрессовых факторов, которые запускают адаптивные метаболические реакции. Среди этих факторов заметное влияние оказывает давление, оказываемое на дисперсную фазу при формировании микрокапсул (рисунок 2.2). В экспериментальных условиях были получены микрокапсулы всех размеров с использованием согласованных технологических параметров: постоянной частоты управления насосом 24,5 Гц и скорости вращения диспергатора 1425 об/мин. Важным наблюдением является то, что производство микрокапсул меньшего размера приводит к увеличению времени пребывания лактобактерий под высоким давлением в 1,8 раза (таблица 3.1). Такое длительное воздействие давления может вызвать значительные метаболические изменения в бактериях, что приводит к изменению их метаболического профиля по сравнению с контрольным образцом *Lpb. plantarum*, который не подвергался такой обработке давлением [205].

Кроме того, кинетическая энергия, генерируемая в процессе центробежного распыления, способствует метаболическим сдвигам, наблюдаемым в микрокапсулированных бактериях. При формировании капсул различного размера скорость вращения диспергатора увеличивается с 900 до 2000 оборотов в минуту (таблица 3.1). По мере увеличения скорости диспергатора для получения микрокапсул меньшего размера кинетическая энергия капле также увеличивается [153]. При ударе о стенки гранулятора часть этой энергии может передаваться бактериальным клеткам, оказывая влияние на их физиологические процессы и выработку вторичных метаболитов.

Формирование оболочки микрокапсул при обработке хлоридом кальция представляет собой еще один критический фактор, потенциально влияющий на метаболизм бактерий. Однако результаты эксперимента показывают, что различные концентрации хлорида кальция от 0,05% до 5,0% не оказывают влияния на жизнеспособность *Lpb. plantarum*.

Эти наблюдения согласуются с результатами кластерного анализа алифатических и циклических соединений в образцах и микрокапсулах *Lpb. plantarum*. Согласно составу и содержанию веществ, они образуют два кластера,

как видно из рисунка 3.18 (В). Первый кластер представлен образцом *Lpb. plantarum*, который содержит уникальный набор соединений, многие из которых отсутствуют в экстрактах микрокапсул. Этот кластер демонстрирует естественный метаболический профиль бактерий до инкапсуляции. Вторая группа включает в себя все образцы микрокапсул, что указывает на то, что процесс микрокапсулирования значительно изменяет метаболический профиль *Lpb. plantarum*. В пределах этого кластера происходит дальнейшая дифференциация в зависимости от размера микрокапсул. Микрокапсулы размером 375 и 200 мкм образуют тесно связанный подкластер, в то время как микрокапсулы размером 250 и 400 мкм имеют более четкие химические характеристики. Эта схема кластеризации позволяет сделать несколько важных выводов. Во-первых, сам процесс инкапсуляции вызывает метаболические изменения в *Lpb. plantarum*. Во-вторых, размер капсулы влияет на метаболическую реакцию бактерий. В-третьих, различные факторы стресса, зависящие от размера, влияют на метаболические пути.

Важно отметить, что по мере уменьшения размера микрокапсул в метаболическом профиле проявляются несколько заметных тенденций. Увеличивается разнообразие ароматических соединений и повышается концентрация ненасыщенных жирных кислот (октодекановой и гексодекановой кислот). Эти жирные кислоты, как правило, отсутствуют в нативном образце *Lpb. plantarum*. Самое высокое общее содержание ненасыщенных жирных кислот наблюдается в самых маленьких микрокапсулах, достигая 4,93 мкг/мл в микрокапсулах размером 200 мкм по сравнению с 3,19 мкг/мл в микрокапсулах размером 400 мкм. Это увеличение представляет собой адаптивную реакцию *Lpb. plantarum* на стресс, вызванный процессом микрокапсулирования [199]. Важным наблюдением является то, что эти специфические ненасыщенные жирные кислоты полностью отсутствовали в образцах *Lpb. plantarum* до микрокапсулирования. Примечательно, что предыдущие исследования показали важную роль ненасыщенных жирных кислот в стимулировании роста лактобактерий, что делает их присутствие в микрокапсулах особенно важным

[205]. Повышенный уровень этих жирных кислот является прямым ответом лактобактерий на стресс, вызванный процессом микрокапсулирования. Этот адаптивный ответ указывает на то, что процедура микрокапсулирования запускает метаболические сдвиги в синтезе вторичных метаболитов в *Lpb. plantarum*. Эти биохимические изменения не являются случайными, а скорее представляют собой систематическую адаптивную реакцию на физические нагрузки, присущие процессу микрокапсулирования. Наблюдаемые метаболические сдвиги ясно демонстрируют, что размер микрокапсул напрямую влияет на характер и степень этих адаптивных реакций.

3.3.5 Выживаемость *Lpb. plantarum* в имитированных условиях желудочно-кишечного тракта

Для подтверждения возможности использования микрокапсулирования с целью защиты клеток *Lpb. plantarum* от неблагоприятных условий желудочно-кишечного использовали систему *in vitro*. Проводили исследование сравнительной выживаемости культуры, как в капсулированной, так и в свободной форме в качестве контроля.

Результаты исследований резистентности капсулированных и не капсулированных лактобактерий к воздействию кислой среды желудка и желчных кислот с панкреатином представлены на рисунке 3.19.

С помощью визуального наблюдения было обнаружено, что форма гранул не изменялась даже после истечения времени экспозиции.

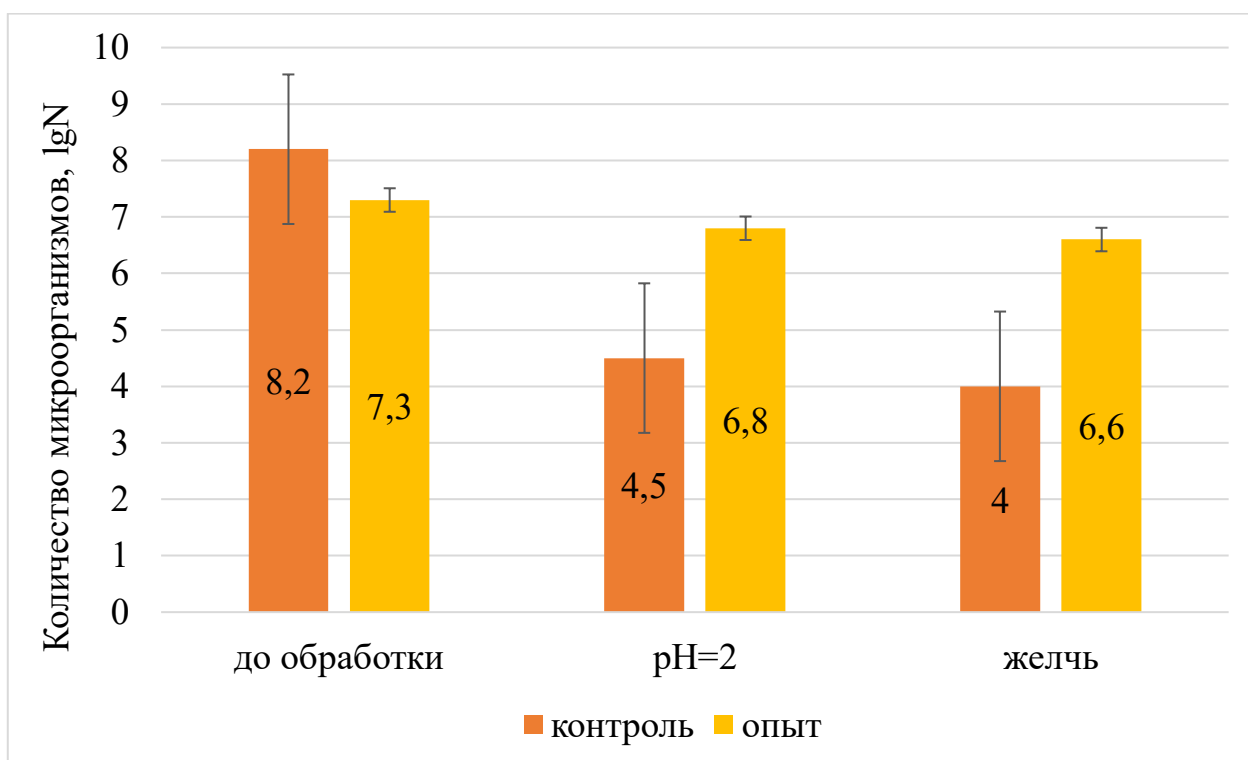


Рисунок 3.19 – Устойчивость лактобактерий к среде ЖКТ: контроль – *Lpb. plantarum* в свободной форме, опыт – сублимированные микрокапсулы *Lpb. plantarum* среднего размера 250 ± 12 мкм

Анализ неблагоприятных факторов, которые представлены на рисунке 3.19, позволяет сделать вывод о том, что наибольшее ингибирующее действие на выживаемость лактобактерий оказало низкое значение pH. В течение 2 часов при pH=2 погибло 46 % свободных клеток, количество жизнеспособных клеток составило 4,5 lg КОЕ/г соответственно для иммобилизованных количество клеток составило 6,8 lg КОЕ/г (93 %).

Исследование влияния желчных кислот на выживаемость лактобактерий показали, что оболочка альгината кальция повысила сохранность и жизнеспособность клеток, количество которых составило 6,6 lg КОЕ/г (90%). Напротив, количество жизнеспособных клеток свободной культуры составило 4,5 lg КОЕ/г, что указывает на гибель клеток в количестве 52 %.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕЩНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *STR. THERMOPHILUS* И *LPB. PLANTARUM* В СВОБОДНОЙ И КАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЕ В МОЛОКЕ

На основании всестороннего анализа данных, представленных в главе 3, можно сделать вывод, что выбор оптимального размера микрокапсул представляет собой компромисс между различными функциональными характеристиками. Не существует единственного «идеального» размера для всех случаев - оптимальность зависит от приоритетов конечного применения.

Однако, если проводить комплексную оценку по совокупности всех исследованных параметров (жизнеспособность, технологичность, стабильность, защитные свойства), с точки зрения универсальности и баланса всех характеристик, оптимальными можно считать капсулы среднего размера 250 ± 12 мкм. Они демонстрируют: достаточный уровень жизнеспособности ($2,0\times 10^7$ КОЕ/г); хорошие показатели насыпной плотности; сбалансированный состав оболочки; экспериментально подтвержденную высокую защитную функцию в условиях ЖКТ.

Сублимированные микрокапсулы являются конечной формой, предназначенной для хранения и дальнейшего использования. В таблице 3.2 представлены данные о стабильности сублимированных микрокапсул при длительном хранении (300 дней при 5 °С). Потеря жизнеспособности клеток за этот период незначительна, что подтверждает эффективность сублимационной сушки для длительного сохранения пробиотика. Вносить в продукт гидратированные капсулы, которые хранятся во влажном состоянии, невозможно из-за риска быстрой потери активности и микробиологической порчи.

Сублимированные микрокапсулы обладают определенной насыпной плотностью (таблица 3.1), что делает их сыпучим продуктом, удобным для дозирования и внесения в кисломолочный продукт. Сухие капсулы размером

250±12 мкм будут равномерно распределяться в продукте, не изменяя существенно его текстуру.

Данные таблицы 3.2 подтверждают, что после сублимации в микрокапсулах содержится высокая концентрация жизнеспособных клеток *Lpb. plantarum*. Эти клетки находятся в анабиотическом состоянии, но готовы к активации при попадании в благоприятную среду. Кисломолочный продукт сам по себе является питательной средой. При внесении сухих микрокапсул в продукт оболочка начнет гидратироваться, а бактерии получать доступ к влаге и питательным веществам, постепенно активируясь уже в самом продукте или в желудочно-кишечном тракте после потребления.

Целью следующей серии экспериментов стало изучение взаимного влияния *Str. thermophilus* и *Lpb. plantarum* в свободной и капсулированной форме при совместном культивировании в молоке. Объектами исследований являлись образцы молока, ферментированные культурами *Str. thermophilus* (закваска отечественного производства, БК-Углич-ТВ) и сублимированной *Lpb. plantarum* в свободной и капсулированной форме.

4.1 Определение оптимальных условий роста *Str. thermophilus* для совместного культивирования с *Lpb. plantarum*

Культуру *Str. thermophilus* предварительно активировали в стерильном обезжиренном молоке в течение 24 часов при оптимальных для микроорганизмов температурах. В полученной материнской закваске определяли титруемую кислотность, рН, количество молочнокислых микроорганизмов (КОЕ/см³).

Предварительно провели серию экспериментов по культивированию *Str. thermophilus* с целью определения дозы внесения и оптимальной температуры

сбраживания. Параллельно готовили 4 образца стерильного обезжиренного молока, в два из которых вносили 3 % активированной культуры, а в другие два – 5 %. Образцы, содержащие разное количество закваски, культивировали при 38 °С и 42 °С. Эта серия исследований необходима в связи с тем, что оптимальной температурой культивирования термофильного стрептококка является температура – 40-42 °С. В то время как, оптимальная температура роста *Lpb. plantarum* приходится на 30-32 °С. Важно определить температуру, подходящую для их дальнейшего совместного культивирования.

В процессе сквашивания во всех образцах определяли титруемую и активную кислотность. В конце сквашивания определяли динамическую вязкость полученных сгустков. Зависимость титруемой кислотности образцов от времени ферментации представлена на рисунке 4.1.

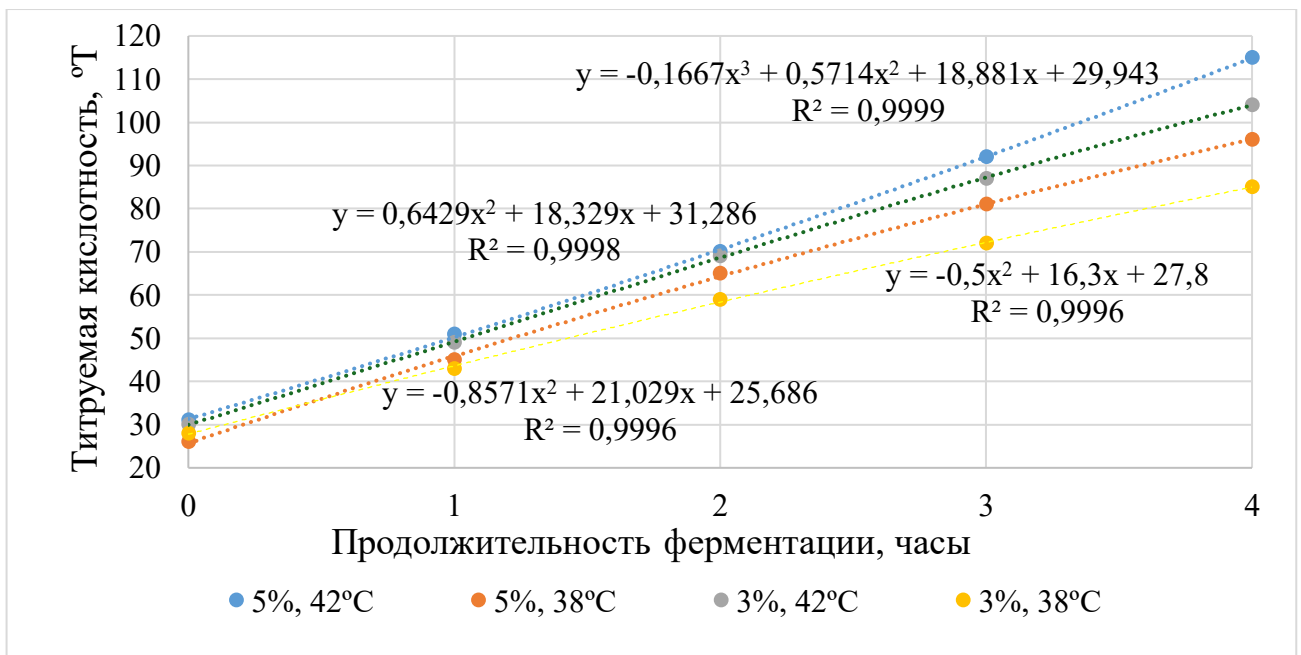


Рисунок 4.1 – Динамика нарастания титруемой кислотности в образцах с *Str. thermophilus*

Проведённое исследование позволило количественно оценить влияние двух технологических факторов, а именно дозы внесения закваски (3 % и 5 %) и температуры ферментации (38 °С и 42 °С) на динамику изменения титруемой

кислотности. Наименьшее значение титруемой кислотности наблюдалось при внесении 3 % культуры и ферментации при 38 °С.

При внесении закваски в количестве 5 % и температуре процесса 42 °С значения титруемой кислотности являются максимальными.

Повышение температуры ферментации с 38 °С до 42 °С закономерно интенсифицирует метаболическую активность культуры *Str. thermophilus*. Для обоих значений концентрации закваски кривые, соответствующие 42 °С, расположены круче и выше, что свидетельствует о более высокой скорости кислотообразования. Данный эффект объясняется приближением к температурному оптимуму термофильных штаммов молочнокислых бактерий, что ускоряет ферментативные реакции утилизации лактозы.

Увеличение дозы вносимой культуры с 3 % до 5 % ожидаемо сокращает продолжительность лаг-фазы и увеличивает удельную скорость роста популяции. При одинаковой температуре образцы с 5 % *Str. thermophilus* демонстрируют более высокую итоговую кислотность на каждом временном отрезке по сравнению с образцами с 3 % заквасочной культуры.

Также во всех образцах определяли значение pH в процессе сквашивания. Результаты представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Динамика снижения активной кислотности в образцах с *Str. thermophilus* ($p \leq 0,05$)

Продолжительность ферментации, часы	Активная кислотность, ед			
	5%/42°С	5%/38°С	3%/42°С	3%/38°С
0	6,50	6,52	6,43	6,53
1	5,94	5,98	6,10	6,18
2	5,39	5,44	5,57	5,67
3	5,13	5,09	5,29	5,32
4	4,88	4,84	5,00	4,98

За 4 часа ферментации во всех образцах наблюдается закономерное и существенное снижение активной кислотности. Начальный уровень pH (6,5) характерен для нормализованного молока, а конечные значения (4,84–5,00) соответствуют стадии формирования плотного сгустка.

На рисунке 4.2 представлены образцы после завершения процесса сквашивания.



Рисунок 4.2 – Фото образцов после 4 часов ферментации

Ключевыми параметрами при оценке качества полученных сгустков являются его прочность и однородность, наличие отделившейся сыворотки, глянцевая поверхность. Образец, полученный при дозе внесения закваски 5 % и температуре сквашивания 38 °С характеризуется наиболее плотным, однородным, с ровной, слегка блестящей поверхностью сгустком. Отсутствует отделение сыворотки. Сбалансированная кинетика процесса (по данным рН и титруемой кислотности) позволяет сформировать стабильную структуру белка, хорошо удерживающую влагу. Образец обладает нежной, кремовой консистенцией и сбалансированным вкусом.

Во всех образцах была определена динамическая вязкость. Результаты представлены на рисунке 4.3.

Динамическая вязкость – ключевой реологический показатель, напрямую характеризующий плотность и прочность сгустка, а также его способность удерживать влагу (противодействовать синерезису).

Образец 1 характеризуется максимальным значением вязкости, что может приводить к разрушению при механическом воздействии – размешивании и свидетельствовать о повышенной склонности к синерезису при хранении.

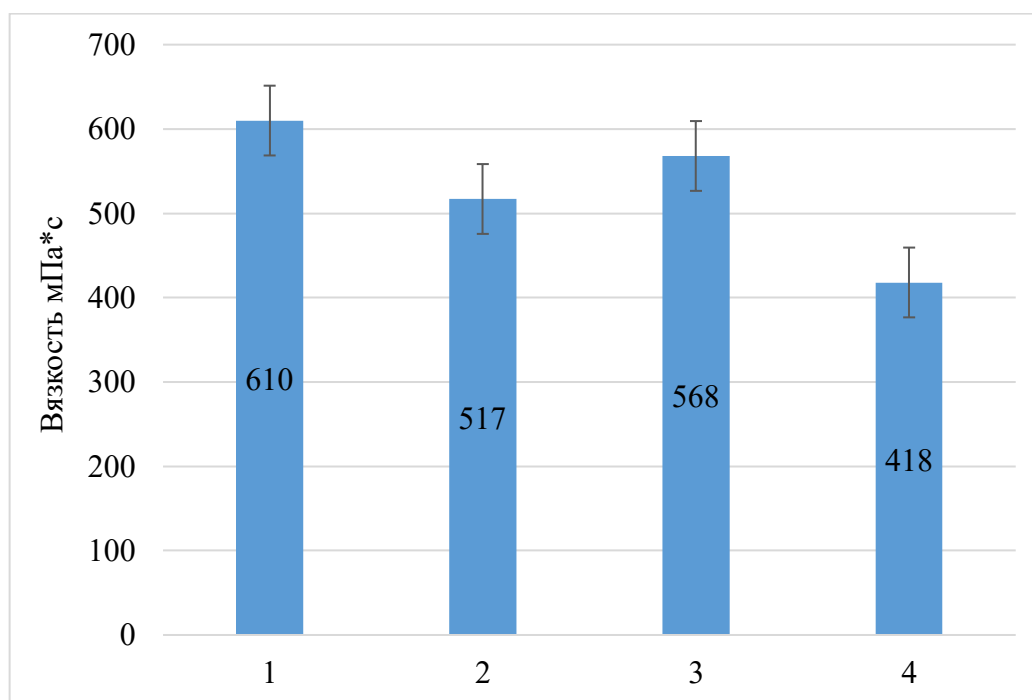


Рисунок 4.3 – Динамическая вязкость образцов с *Str. thermophilus* (1 – 5 % закваски при 42 °С; 2 – 5 % закваски при 38 °С; 3 – 3 % закваски при 42 °С; 4 – 3 % закваски при 38 °С)

Образец 2 также отличается высокой вязкостью, но, в отличие от образца 1, его структура более эластичная и устойчивая к разрушению. Данный показатель является идеальным для нашего конечного продукта. Образец 3 отличается рыхлым, несформированным сгустком. Повышение температуры сквашивания при низкой дозе внесения закваски не позволило сформировать плотную структуру белка. В образце 4 наблюдалась наименьшая интенсивность кислотообразования за 4 часа, что привело к формированию очень нежного, слабого сгустка. Низкая концентрация микроорганизмов и недостаточная для максимальной скорости сквашивания температура привели к образованию сгустка, характеризующегося наименьшей вязкостью, с консистенцией близкой к питьевому йогурту или жидкой простокваше.

Проведённое комплексное исследование влияния концентрации закваски (3 % и 5 %) и температуры ферментации (38 °С и 42 °С) на процесс сквашивания с *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* позволило установить чёткие количественные закономерности и сформулировать технологически

обоснованные рекомендации. Концентрация закваски – ключевой фактор, определяющий скорость и интенсивность процесса на старте. Повышение с 3 % до 5 % гарантированно увеличивает скорость кислотообразования и плотность сгустка в заданный промежуток времени. Температура - фактор, который по-разному влияет на кинетику сквашивания в зависимости от дозы внесения закваски.

На основании анализа, с целью дальнейшего использования при совместной ферментации для получения материнской закваски нами была определена доза внесения *Str. thermophilus* на уровне $5,0 \pm 0,25$ % от объема стерильного обезжиренного молока, и температура культивирования 38 ± 2 °С. При данных условиях обеспечивается оптимальное сочетание скорости процесса сквашивания (3,2 ч) и значения титруемой кислотности 90 °Т, при котором формируется плотный стабильный сгусток без синерезиса, и необходимые органолептические свойства.

4.2 Изучение динамики совместного культивирования *Lpb. plantarum* в свободной форме и *Str. thermophilus* в молочной среде

Культуры *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* предварительно активировали в стерильном обезжиренном молоке в течение 24 часов при оптимальных для микроорганизмов температурах.

В полученных материнских заквасках определяли титруемую кислотность, рН, количество молочнокислых микроорганизмов (КОЕ/см³) и динамическую вязкость полученных сгустков (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Характеристика заквасок перед внесением в молоко ($p \leq 0,05$)

Тип закваски	Титруемая кислотность, °Т	pH, ед.	КОЕ/см ³	Вязкость мПа*с
<i>Lpb. plantarum</i>	140	4,59	$1 \cdot 10^{10}$	303
<i>Str. thermophilus</i>	135	4,70	$2 \cdot 10^9$	510

Далее закваску вносили в обезжиренное молоко в количестве суммарно 5 % от объема образца в трёх различных соотношениях *Lpb. plantarum*/ *Str. thermophilus*: 3,5 %/1,5 %; 2,5 %/2,5 %; и 1,5 %/3,5%.

В процессе сквашивания в образцах определяли титруемую и активную кислотность. По истечении четырех часов ферментации проводили количественный учет молочнокислых микроорганизмов, измеряли вязкость полученных сгустков и определяли антиоксидантную активность.

Динамика изменения титруемой кислотности в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* представлена на рисунке 4.4.

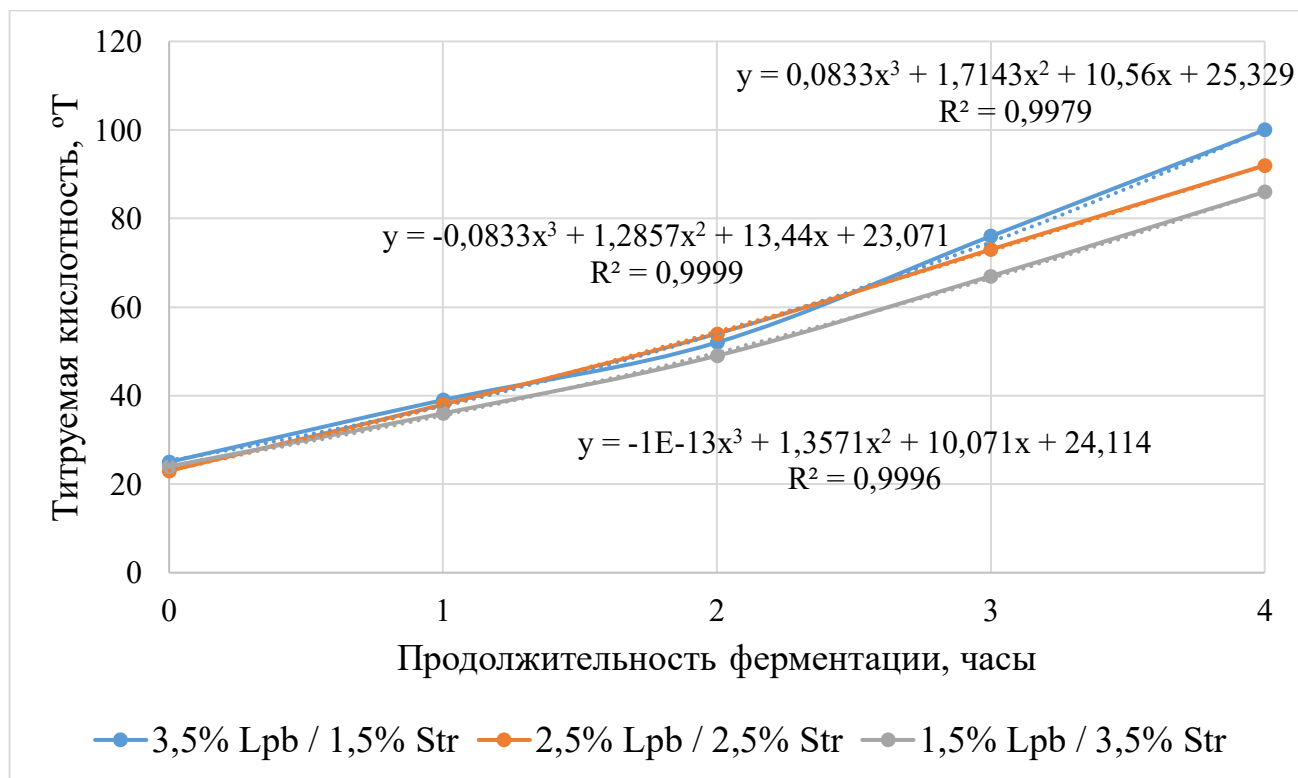


Рисунок 4.4 – Зависимость титруемой кислотности от времени культивирования в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* при различных соотношениях культур

При проведении исследования оценивалась скорость роста титруемой кислотности в первые часы культивирования и ее максимальные значения. *Str. thermophilus* обычно активен в начале процесса и быстрее ферментирует лактозу. *Lpb. plantarum*, будучи термотолерантной гетероферментативной палочкой, часто влияет на кислотообразование в поздней фазе и формирование окончательного вкусо-ароматического профиля. Также анализировали, как соотношение культур влияет на продолжительность процесса сквашивания. Важно было оценить, проявляется ли синергетический эффект между культурами. *Str. thermophilus*, который быстро производит молочную кислоту, может стимулировать рост *Lpb. plantarum*, а он в свою очередь, способен вырабатывать дополнительные метаболиты, благоприятные для жизнедеятельности стептококка. В образце с большим количеством *Lpb. plantarum* в первые часы культивирования скорость нарастания кислотности находится на среднем уровне, однако продукт характеризуется высокой кислотностью в конце процесса (100 °Т). В образце, где преобладает *Str. thermophilus* напротив, на начальном этапе идет активное кислотообразование, а конечная кислотность сохраняется на уровне средних значений (86 °Т). Оптимальным соотношением культур с точки зрения нарастания титруемой кислотности является их внесение в количестве 2,5 %/2,5 %. При таких условиях происходит взаимная стимуляция действия молочнокислых микроорганизмов.

Динамика изменения активной кислотности в образцах с различным соотношением культур представлена в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Зависимость активной кислотности от времени культивирования в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* при различных соотношениях культур ($p \leq 0,05$)

Образец (<i>Lpb. plantarum</i> / <i>Str. thermophilus</i>)	Активная кислотность, рН после культивирования в течение				
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч
3,5 %/1,5 %	6,63	6,22	5,81	5,42	5,01
2,5 %/2,5 %	6,62	6,26	5,88	5,46	5,04
1,5 %/3,5%	6,62	6,32	6,00	5,51	5,04

В течение первого часа культивирования снижение уровня pH было тем меньше, чем выше доля термофильного стрептококка. Это может указывать на то, что кислотообразование уже на начальном этапе зависит от *Lpb. plantarum*, либо от их эффективного взаимодействия. В течение следующих часов значение pH в образцах стабилизируется, однако более низкий уровень сохраняется в продукте с преобладанием палочковых культур. Это свидетельствует о высокой кислотообразующей активности данного штамма в указанных условиях.

Оптимальным с точки зрения достижения минимального значения pH является соотношение культур с преобладанием *Lpb. plantarum*. Однако для получения более мягкого, деликатного вкуса и лучшей консистенции за счёт экзополисахаридов стрептококка предпочтительным является более высокое конечное значение pH образца с равным соотношением культур, несмотря на немного сниженную титруемую кислотность.

В первом образце *Lpb. plantarum* – кислотоустойчивая палочка, характеризуется активным ростом и доминированием в течение всего процесса сквашивания (низкий pH 5,01 к 4 ч подтверждает её активность). К концу культивирования достигается максимальный титр.

Сбалансированный рост обоих штаммов, а возможно и синергия наблюдается в образце с равным соотношением микроорганизмов. Однако из-за более высокого конечного значения pH (5,04) общая метаболическая активность чуть ниже, чем в образце 1. Оба штамма находятся в стабильной фазе, но *Str. thermophilus* может начать раньше снижать активность.

В образце 3 *Str. thermophilus* быстро достиг пика роста, но остается чувствительным к накопленной кислоте. К концу процесса сквашивания его количество может снизиться. *Lpb. plantarum*, хотя и является кислотоустойчивым, здесь присутствует в малой концентрации и не способен компенсировать спад количества кокков. Таким образом, менее активной палочкой и снижающимся числом кокков определяется минимальное общее количество молочнокислых микроорганизмов.

Совместный рост молочнокислых микроорганизмов на тест-пластинах представлен на рисунке 4.5.

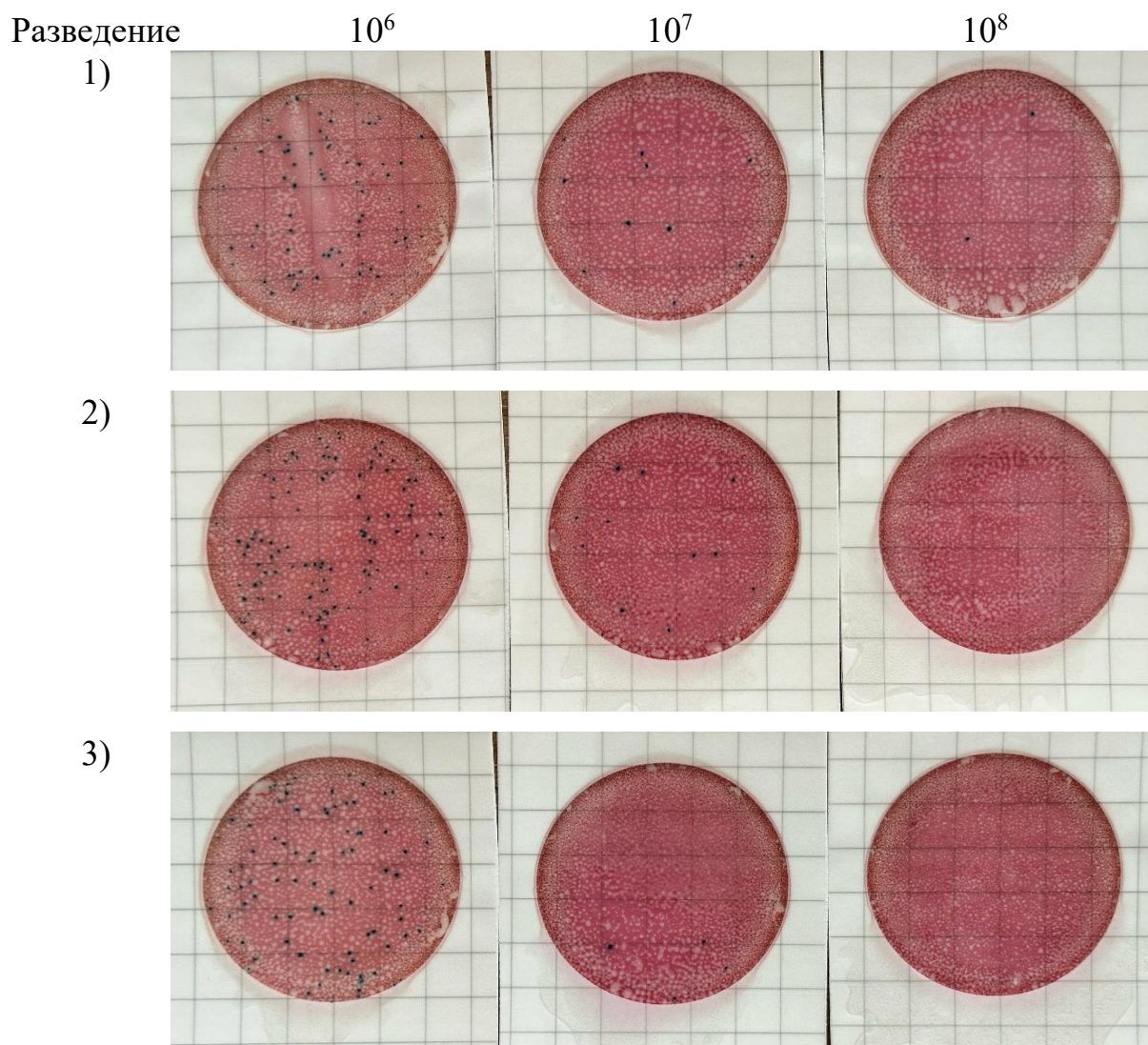


Рисунок 4.5 – Рост культур на тест-пластинах в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* (1 – 3,5 %/1,5 %; 2 – 2,5 %/2,5 %; 3 – 1,5 %/3,5%).

Результаты количественного учета в образцах представлены на рисунке 4.6. Для пробиотических продуктов важным критерием является максимальный и стабильный титр микроорганизмов на конец срока годности.

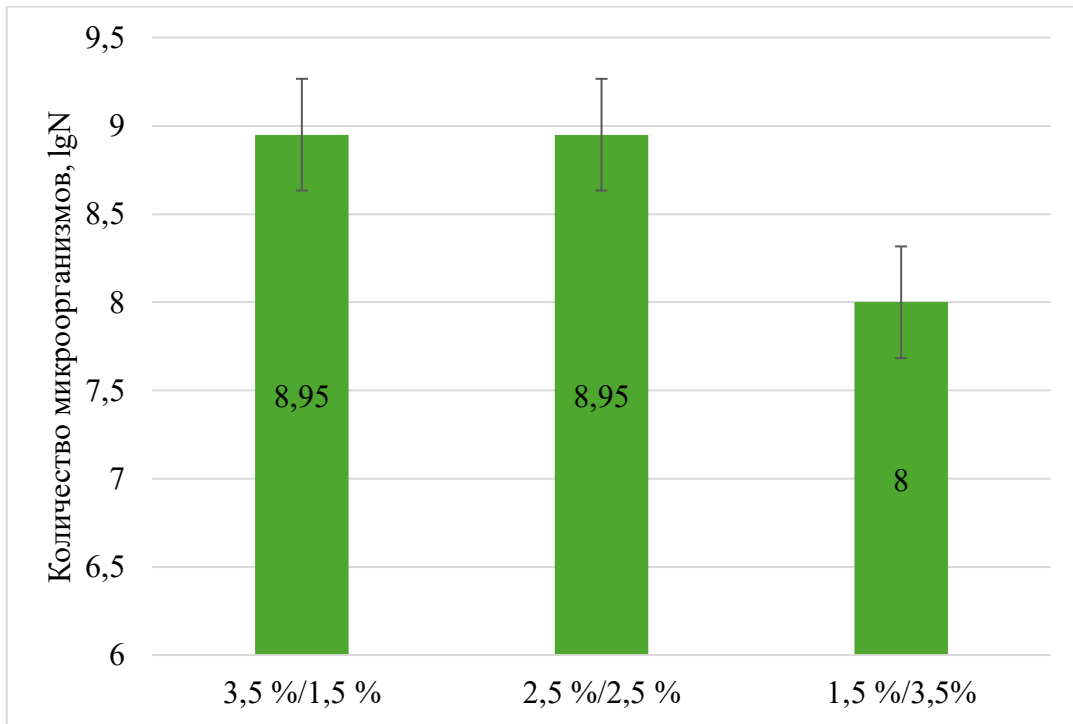


Рисунок 4.6 – Количественный учет микроорганизмов в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* при различных соотношениях культур

В этом случае оптимально соотношение *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* – 3,5%/1,5%. Однако высокий уровень *Lpb. plantarum* (в образце 1) может придавать продукту более выраженный кислый вкус, что нравится не всем потребителям. Более мягкий вкус может наблюдаться у образцов 2 или 3, даже при меньшем общем количестве молочнокислых микроорганизмов.

Вязкость полученных при различных соотношениях *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* представлена в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Вязкость образцов после 4 часов культивирования ($p \leq 0,05$)

Образец	Вязкость мПа*с
<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 3,5%/1,5%	663
<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 2,5%/2,5%	520
<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 1,5%/3,5%	460

С увеличением доли *Lpb. plantarum* в заквасочной смеси вязкость готового продукта возрастает. В первом образце преобладает культура *Lpb. plantarum*, способный синтезировать экзополисахариды, действующие как натуральные

загустители и стабилизаторы, напрямую увеличивая вязкость и формируя более плотный сгусток. Низкое значение рН указывает на более интенсивный процесс коагуляции казеина и образованию плотной белковой матрицы. Протеолиз может способствовать лучшей гидратации белков и укреплению структуры. *Str. thermophilus* – культура, преобладающая в образце 3, характеризуется в данном конкретном случае меньшим вкладом в структурообразование, по сравнению с используемым штаммом *Lpb. plantarum*.

Быстрое и резкое нарастание кислотности на начальном этапе сквашивания может приводить к образованию крупных и грубых хлопьев казеина, что формирует менее однородный, менее вязкий сгусток с отделением сыворотки. Высокое значение рН в конце процесса также указывает на менее глубокую денатурацию белка с образованием слабой гелевой структуры.

Равное количество культур в образце 2 не привело к максимальной вязкости полученного сгустка, что может означать отсутствие синергетического эффекта в плане структурообразования для данных конкретных штаммов. Их совместное развитие обеспечило промежуточный результат.

Выявленная зависимость позволяет целенаправленно управлять реологическими свойствами продукта на этапе подбора соотношения заквасочной микрофлоры, не прибегая к использованию стабилизаторов.

В ходе проведения экспериментальных исследований антиоксидантной активности образцов со свободной пробиотической культурой было установлено, что соотношение культур оказывает существенное влияние на конечную антирадикальную активность ферментированных образцов.

Значения антиоксидантной активности (АОА) исследуемых вариантов варьировались в пределах от 0,34 до 0,48 мМ тролокса (таблица 4.5). Установлено, что максимальным антиоксидантным действием обладает образец с преобладанием клеток *Lpb. plantarum* (свободная форма) над *Str. thermophilus* в соотношении 3,5 % к 1,5 %. Минимальное значение зафиксировано для образца с противоположным соотношением культур (1,5 % *Lpb. plantarum* и 3,5 % *Str. thermophilus*).

Таблица 4.5 – Антиоксидантная активность ($p \leq 0,05$)

№ п/п	Образец	АОА, мМ тролокса
1.	<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 3,5%/1,5%	0,48
2.	<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 2,5%/2,5%	0,41
3.	<i>Lpb. plantarum</i> (свободная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 1,5%/3,5%	0,34

Полученные данные свидетельствуют о наличии синергетического эффекта и позволяют предположить, что увеличение доли *Lpb. plantarum* способствует более интенсивному накоплению антиоксидантных метаболитов в системе, что может являться обоснованием при выборе оптимальной концентрации для разработки продуктов с повышенной биологической ценностью.

4.3 Исследование динамики совместного культивирования *Lpb. plantarum* в капсулированной форме и *Str. thermophilus* в молочной среде

Капсулированную культуру *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lpb. plantarum/A2*) и *Str. thermophilus* предварительно активировали в стерильном обезжиренном молоке в течение 24 часов при оптимальных для микроорганизмов температурах.

В полученных заквасках определяли титруемую кислотность, рН, количество молочнокислых микроорганизмов (КОЕ/см³) и динамическую вязкость полученных сгустков. Результаты представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Характеристика заквасок перед внесением в молоко ($p \leq 0,05$)

Тип закваски	Титруемая кислотность, °Т	рН, ед.	КОЕ/см ³	Вязкость мПа*с
<i>Lpb. plantarum/A2</i>	113	4,88	1*10 ⁹	405
<i>Str. thermophilus</i>	135	4,70	2*10 ⁹	510

Далее вносили в молоко в количестве суммарно 5 % от объема образца в трёх различных соотношениях *Lpb. plantarum*/A2/ *Str. thermophilus*: 3,5 %/1,5 %; 2,5 %/2,5 %; и 1,5 %/3,5 %.

В процессе сквашивания в образцах определяли титруемую и активную кислотность. По истечении четырех часов ферментации проводили количественный учет молочнокислых микроорганизмов, измеряли вязкость полученных сгустков и определяли антиоксидантную активность.

Динамика изменения титруемой кислотности в образцах с *Lpb. plantarum*/A2 и *Str. thermophilus* представлена на рисунке 4.7.

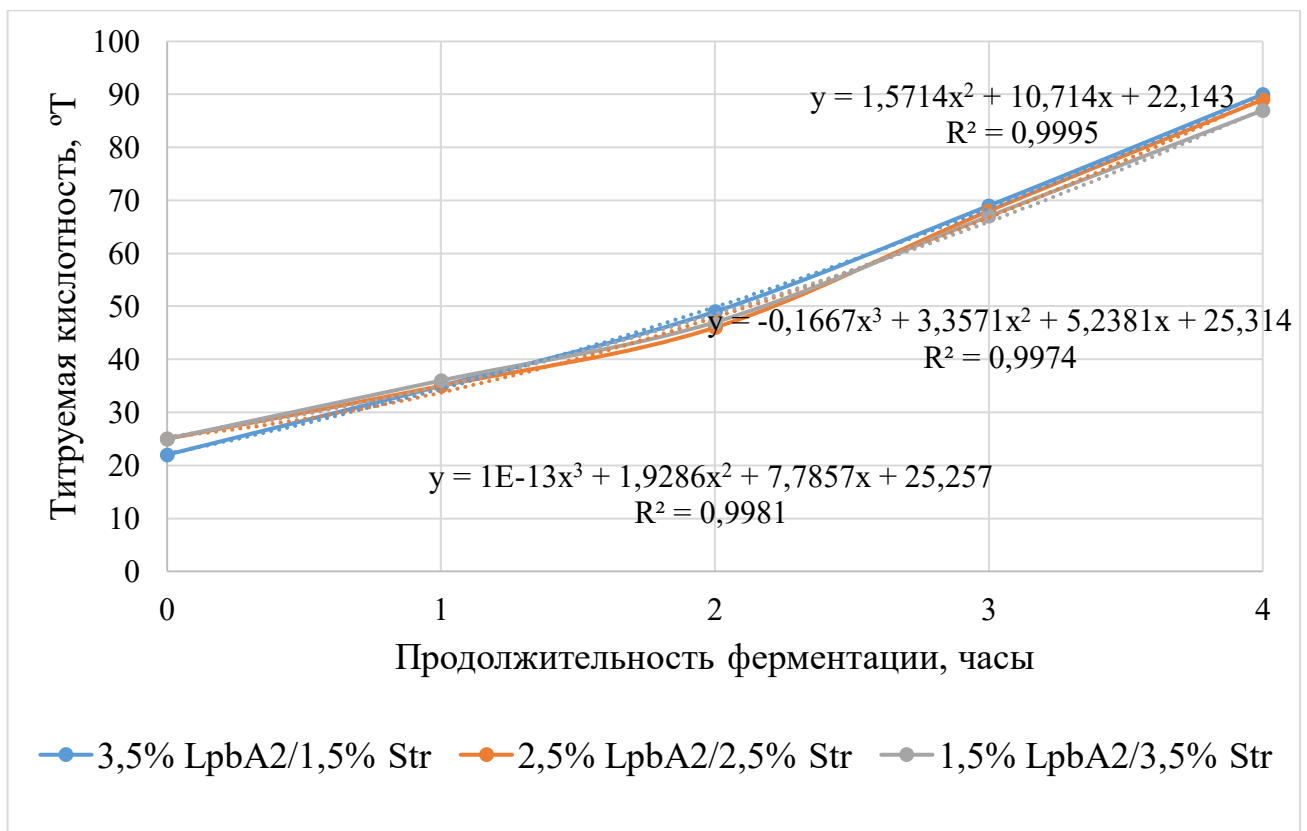


Рисунок 4.7 – Зависимость титруемой кислотности от времени культивирования в образцах с *Lpb. plantarum*/A2 и *Str. thermophilus*

Анализ данных показывает, что преобладание капсулированной *Lpb. plantarum* приводит к прогрессирующему накоплению кислоты. Это может быть связано с постепенным высвобождением клеток из капсул, синергическим стимулированием *Str. thermophilus*, устойчивой метаболической активностью в течение всего процесса.

Равное соотношение культур обеспечивает максимальную скорость в начале процесса с последующим замедлением. Причинами могут быть такие факторы, как конкуренция за субстрат, возможное накопление ингибирующих метаболитов, рН достигает критического значения для одного из штаммов.

Преобладание *Str. thermophilus* приводит к умеренной скорости процесса. *Str. thermophilus* активен на ранних стадиях сквашивания, но его активность может ограничиваться накоплением кислоты.

Динамика активной кислотности в образцах с различным соотношением культур представлена в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Зависимость активной кислотности от времени культивирования в образцах с *Lpb. plantarum/A2* и *Str. thermophilus* ($p \leq 0,05$)

Образец (<i>Lpb. plantarum/A2</i> и <i>Str. thermophilus</i>)	Активная кислотность, рН после культивирования в течение				
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч
3,5 %/1,5 %	6,62	6,31	5,99	5,54	5,08
2,5 %/2,5 %	6,60	6,27	5,92	5,50	5,09
1,5 %/3,5%	6,52	6,23	5,93	5,53	5,11

Наибольшее общее снижение рН наблюдается в образце с преобладанием капсулированной формы *Lpb. plantarum/A2* (3,5%/1,5%). В первые часы культивирования образец с равным соотношением культур демонстрирует максимальную скорость снижения рН. Через три часа первый образец наращивает активность, в то время как капсулированная форма *Lpb. plantarum/A2* демонстрирует отсроченный эффект. Максимальная скорость изменения уровня рН у всех образцов отмечается в последний час процесса сквашивания.

Все образцы достигают рН ниже 5,2 к четвертому часу, что обеспечивает полную коагуляцию казеина, хорошую текстуру и микробиологическую стабильность.

Совместный рост молочнокислых микроорганизмов на тест-пластинах представлен на рисунке 4.8.

Результаты количественного учета в образцах представлены на рисунке 4.9.

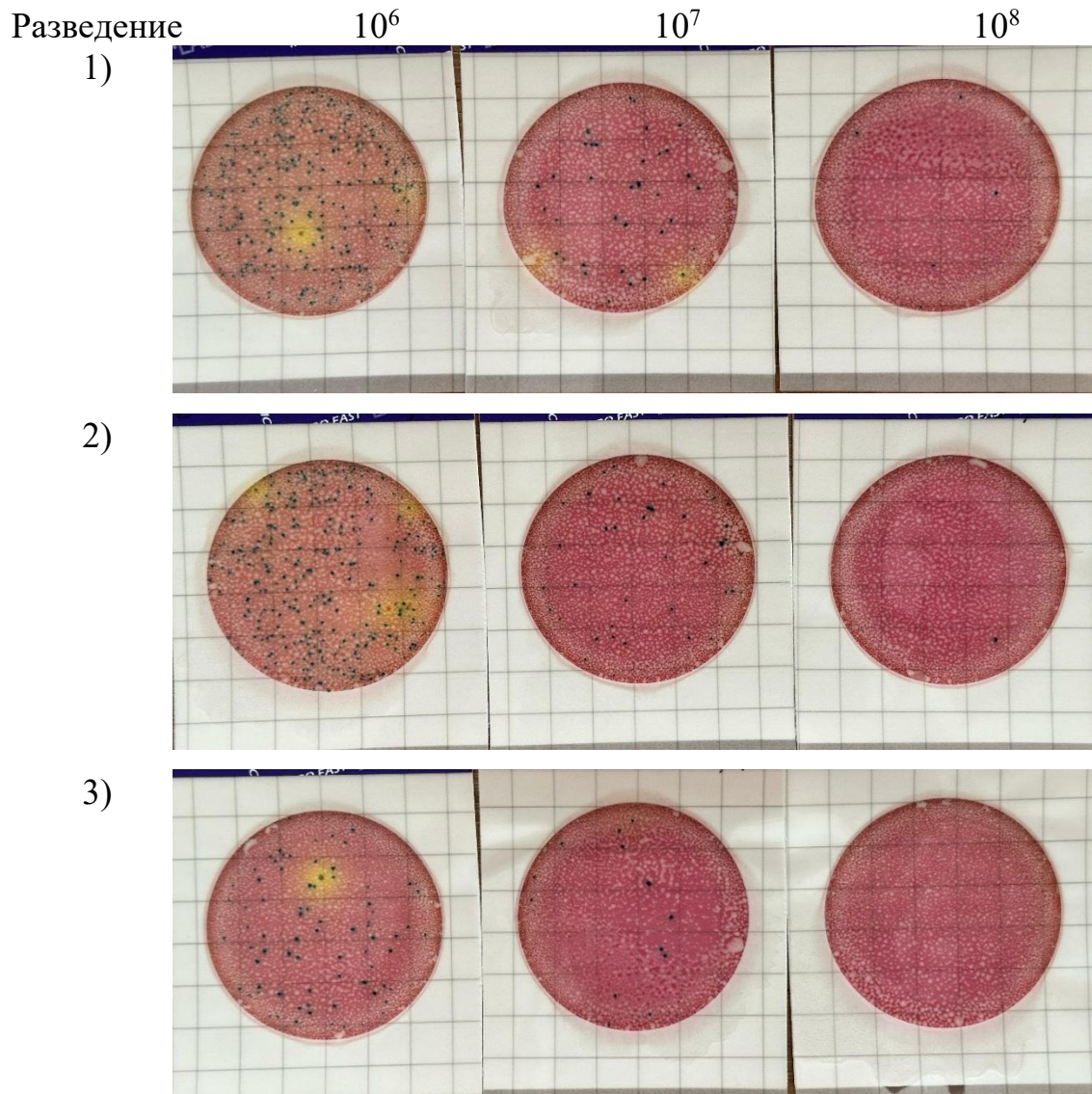


Рисунок 4.8 – Рост культур на тест пластинах в образцах с *Lpb. plantarum/A2* и *Str. thermophilus* (1 - 3,5%/1,5%; 2 - 2,5 %/2,5 %; 3 - 1,5 %/3,5%).

Преобладание капсулированной *Lpb. plantarum* способствует сохранению жизнеспособности клеток. Наибольшая выживаемость микроорганизмов отмечается в образце 3,5%/1,5%. Оболочка капсулы защищает *Lpb. plantarum* от быстрого снижения pH, конкуренции за субстрат и накопления метаболитов. Высокое содержание КОЕ (10^8 КОЕ/см³) во всех образцах соответствует требованиям для пробиотических продуктов, однако образец 3,5%/1,5% будет оказывать наибольшее пробиотическое действие.

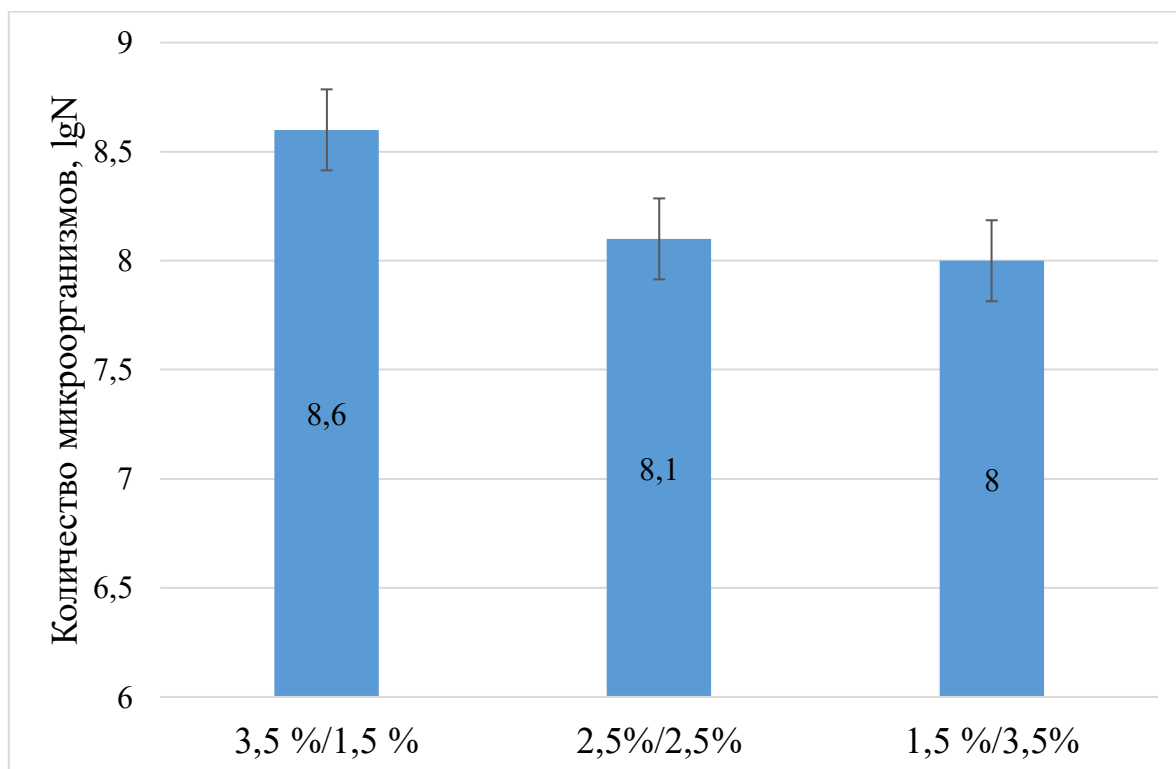


Рисунок 4.9 – Количественный учет микроорганизмов в образцах с *Lpb. plantarum/A2* и *Str. thermophilus*

Вязкость полученных при различных соотношениях *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* представлена в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Вязкость образцов после 4 часов культивирования ($p \leq 0,05$)

Образец	Вязкость мПа*с
<i>Lpb. plantarum</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 3,5%/1,5%	717
<i>Lpb. plantarum</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 2,5%/2,5%	693
<i>Lpb. plantarum</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 1,5%/3,5%	643

Lpb. plantarum, как уже было показано выше обладает способностью продуцировать экзополисахариды, которые в свою очередь увеличивают вязкость, улучшают текстуру сгустка. Капсулированная форма может стимулировать выработку экзополисахаридов. При преобладании *Lpb. plantarum/A2* формируется более однородный, плотный сгусток, *Str. thermophilus* может давать более рыхлую структуру. Более высокая вязкость ассоциируется с насыщенным вкусом, меньшей склонностью к синерезису. Вязкость >700 мПа·с оптимальна для таких продуктов, как греческий йогурт, творожные продукты, десерты на основе ферментированного молока.

Этот анализ подтверждает, что капсулирование и соотношение культур являются критическими факторами для контроля текстуры ферментированных молочных продуктов, а соотношение *Lpb. plantarum/A2/Str. thermophilus* 3,5 %/1,5 % обеспечивает наилучшие реологические свойства.

Исследование антиоксидантной активности образцов, содержащих капсулированную форму *Lpb. plantarum/A2*, показало общую тенденцию к повышению значений АОА (таблица 4.9). Это вероятно обусловлено пролонгированным высвобождением метаболитов и защитой клеток от повреждающих факторов в процессе ферментации.

Таблица 4.9 – Антиоксидантная активность ($p \leq 0,05$)

№ п/п	Образец	АОА, мМ тролокса
1.	<i>Lpb. plantarum/A2</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 3,5%/1,5%	0,52
2.	<i>Lpb. plantarum/A2</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 2,5%/2,5%	0,49
3.	<i>Lpb. plantarum/A2</i> (капсулированная форма) и <i>Str. thermophilus</i> 1,5%/3,5%	0,45

Зафиксированные значения антиоксидантной активности варьировались от 0,45 до 0,52 мМ тролокса, что превышает показатели образцов с аналогичным соотношением, но со свободными клетками. Наибольшая эффективность установлена для образца с максимальным содержанием капсулированной формы *Lpb. plantarum/A2* (3,5 %) в сочетании с 1,5% *Str. thermophilus*, где АОА достигла 0,52 мМ тролокса. При увеличении доли *Str. thermophilus* до 3,5 % наблюдается

некоторое снижение активности до 0,45 мМ тролокса, что подтверждает вклад именно капсулированной формы *Lpb. plantarum/A2* в формирование антиоксидантного потенциала системы. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения капсулированных форм пробиотиков для усиления функциональных свойств ферментированных продуктов.

4.4 Исследование влияния совместной ферментации *Lpb. plantarum* в свободной и капсулированной формах и *Str. thermophilus* на качественные характеристики кисломолочного продукта при длительном хранении

Исследовалось влияние процесса капсулирования *Lpb. plantarum*, а также культивирования свободной и капсулированной форм *Lpb. plantarum* в присутствии *Str. thermophilus*. Также рассматривалось влияние различных соотношений культур на рН, титруемую кислотность и количество молочнокислых микроорганизмов в исследуемых образцах. Образцы хранили при температуре 2-4 °С в течение 18 суток. Измерение титруемой кислотности и рН образцов проводили раз в три дня. Количественный учёт микроорганизмов проводили на 18 сутки хранения.

Динамика изменения титруемой кислотности в образцах со свободной формой *Lpb. plantarum* представлена в таблице 4.10.

В соответствии с ГОСТ 32923-2014 [206] предельная титруемая кислотность 120 °Т кисломолочного продукта при большем содержании *Lpb. plantarum* была достигнута на 3 сутки.

Таблица 4.10 – Зависимость титруемой кислотности от длительности хранения ($p \leq 0,05$)

Продолжительность хранения продукта, сутки	Титруемая кислотность, °Т		
	Соотношение культур (<i>Lpb. plantarum</i> / <i>Str. thermophilus</i>)		
	3,5 %/1,5 %	2,5 %/2,5 %	1,5 %/3,5%
1	109	100	94
3	117	110	106
6	140	132	118
9	157	145	132
12	180	164	148
15	185	170	155
18	192	179	161

В образце, с наименьшим содержанием пробиотической культуры нарастание титруемой кислотности происходило значительно медленнее, и предельных значений для продукта она достигла на 6 сутки. Это может указывать на то, что *Lpb. plantarum* в процессе жизнедеятельности образует большее количество молочной кислоты, чем *Str. thermophilus*. При содержании свободной формы *Lpb. plantarum* на уровне 2,5 % и выше, продукт превышает допустимую кислотность (100 °Т) уже в течение первой недели хранения. Это критический недостаток для длительного срока годности, так как к моменту потребления продукт будет иметь чрезмерно кислый вкус.

Во всех образцах наблюдается устойчивое снижение рН в течение 18 суток хранения (таблица 4.11), что сопоставимо с ростом титруемой кислотности. Снижение рН напрямую зависит от доли *Lpb. plantarum* в составе заквасочной культуры.

Таблица 4.11 – Зависимость активной кислотности от длительности хранения ($p \leq 0,05$)

Продолжительность хранения продукта, сутки	рН, ед.		
	Соотношение культур (<i>Lpb. plantarum</i> / <i>Str. thermophilus</i>)		
	3,5 %/1,5 %	2,5 %/2,5 %	1,5 %/3,5%
1	4,92	4,98	4,99
3	4,85	4,90	4,91
6	4,78	4,83	4,84
9	4,70	4,75	4,77
12	4,63	4,69	4,72
15	4,57	4,62	4,65
18	4,50	4,56	4,59

Все образцы в начале хранения имеют уже относительно низкие значения рН (4,92–4,99), характерные для свежего кисломолочного продукта. Независимо от соотношения культур, за 18 суток рН снижается примерно на 0,40–0,42 единицы, что свидетельствует о постоянной и активной выработке молочной кислоты. Уже к 9-12 суткам рН во всех образцах опускается ниже 4,75, а к концу срока – ниже 4,6. Это указывает на неконтролируемое закисление, которое негативно влияет на вкус и на структуру продукта. Резкое снижение рН соотносится с быстрым достижением и даже превышением нормы титруемой кислотности для данной группы продуктов в 120 °С.

Результаты количественного учета микроорганизмов на 18-е сутки представлены на рисунке 4.10.

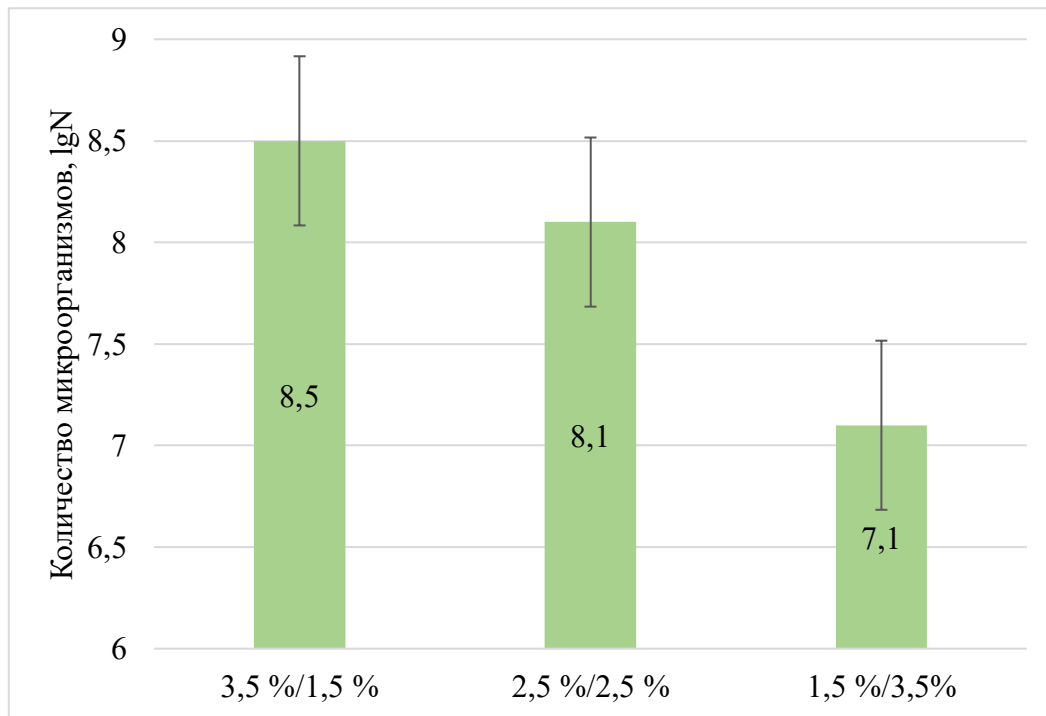


Рисунок 4.10 – Количественный учет микроорганизмов в образцах с *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* на 18 сутки хранения

Анализ данных выживаемости показывает, что даже в свободной форме *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* по количеству молочнокислых микроорганизмов соответствуют нормативным требованиям к пробиотическим продуктам (не менее 10^6 – 10^7 КОЕ/см³ на конец срока годности). Все образцы демонстрируют высокую выживаемость микроорганизмов к 18-м суткам

хранения. Это подтверждает, что *Lpb. plantarum* и *Str. thermophilus* устойчивы к условиям холодильного хранения и накоплению собственной молочной кислоты.

Более высокая начальная доза пробиотика обеспечивает большую выживаемость клеток к концу срока хранения. Однако важно отметить, что высокая кислотность (до 192 °Т, рН – 4,5) в образцах с большей долей *Lpb. plantarum* не привела к гибели культуры. Это говорит о высокой кислотоустойчивости данных штаммов. Свободная форма *Lpb. plantarum* обеспечивает хорошую, но не максимальную жизнеспособность при длительном хранении.

Результаты исследования изменения титруемой кислотности в образцах с капсулированной культурой *Lpb. plantarum/A2* представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12 – Зависимость титруемой кислотности от длительности хранения ($p \leq 0,05$)

Продолжительность хранения продукта, сутки	Титруемая кислотность, °Т		
	Соотношение культур (<i>Lpb. plantarum/A2/Str. thermophilus</i>)		
	3,5 %/1,5 %	2,5 %/2,5 %	1,5 %/3,5%
1	94	92	90
3	108	106	104
6	130	118	110
9	145	132	116
12	164	148	122
15	170	155	138
18	179	161	142

Наблюдается значительное замедление нарастания титруемой кислотности по сравнению со свободной формой. Начальные значения ниже, а темпы роста существенно снижены, что указывает на контролируемое и пролонгированное высвобождение активных клеток из капсул. Эффект напрямую зависит от доли инкапсулированного пробиотика.

Капсулирование обеспечивает сравнительно низкую начальную титруемую кислотность (на 12-19 °Т ниже по сравнению со свободной формой). Это свидетельствует о барьерной функции капсулы в первые дни хранения. Темп нарастания кислотности не только снижен, но и носит более линейный и предсказуемый характер. Это позволяет точно прогнозировать срок достижения

критических значений. Сдерживающий эффект капсулирования наиболее выражен при низких дозах пробиотика (1,5% и 2,5%). При высокой дозе (3,5%) массовое высвобождение клеток приводит к относительно быстрому кислотообразованию, но с задержкой во времени.

Для продуктов с продленным сроком хранения (12 суток) оптимально соотношение 1,5% капсулированного *Lpb. plantarum*/3,5% *Str. thermophilus*. Кислотность остаётся под контролем практически в течение всего срока хранения.

Для баланса между пробиотической активностью и стабильностью оптимально соотношение 2,5%/2,5 %. Оно обеспечивает задержку в повышении кислотности (до 6 суток) при сохранении достаточного количества пробиотика. Даже при внесении высокой дозы пробиотика (3,5%) капсулирование даёт возможность увеличить время до достижения критических значений кислотности на 3 суток, что может быть критично для логистики.

По сравнению со свободной формой культуры в данном случае кинетика изменения pH принципиально отличается (таблица 4.13). Начальные значения существенно выше, а скорость снижения медленнее, что может свидетельствовать о контролируемом метаболическом процессе, благодаря предварительному капсулированию культуры пробиотиков.

Таблица 4.13 – Зависимость активной кислотности от длительности хранения ($p \leq 0,05$)

Продолжительность хранения продукта, сутки	pH, ед.		
	Соотношение культур (<i>Lpb. plantarum</i> /A2/ <i>Str. thermophilus</i>)		
	3,5 %/1,5 %	2,5 %/2,5 %	1,5 %/3,5%
1	5,26	5,51	5,65
3	5,19	5,39	5,56
6	5,11	5,31	5,46
9	5,03	5,22	5,39
12	4,95	5,16	5,33
15	4,98	5,09	5,25
18	4,91	5,01	5,18

Инкапсуляция обеспечивает более высокий начальный показатель pH (на 0,3–0,7 единиц выше, чем у образцов со свободной культурой). Это напрямую

влияет на формирование благоприятного вкуса продукта уже с первых дней хранения и создает «запас» времени до достижения пороговых значений.

Средняя скорость снижения рН у капсулированных форм в 1,5–2 раза ниже, чем у свободных. Это прямое следствие контролируемого высвобождения активных клеток и метаболитов. К 15–18-м суткам снижение рН у капсулированных образцов имеет тенденцию к выходу на плато. Это указывает на истощение ресурсов или адаптацию системы.

Замедленная динамика снижения рН полностью согласуется с замедленным ростом титруемой кислотности. Например, образец 1,5%/3,5% с капсулированной формой к 12-м суткам имеет рН 5,33 и кислотность 122 °Т, что является идеальным балансом для пробиотического продукта длительного хранения.

Анализ данных таблицы 4.13 подтверждает, что капсулирование трансформирует процесс кислотообразования из неуправляемого и быстрого в программируемый и замедленный. Это позволяет не просто продлить срок годности, но и гарантировать сохранение заданных высоких органолептических и физико-химических показателей на протяжении всего 12-суточного периода хранения. С точки зрения контроля активной кислотности, капсулирование является незаменимым инструментом для создания инновационных, стабильных пробиотических продуктов.

Количество микроорганизмов после 18 суток хранения в образцах с капсулированной пробиотической культурой представлено на рисунке 4.11.

Как показали исследования рН и титруемой кислотности, среда в образцах с капсулированными формами менее кислая на всех этапах хранения. Это напрямую способствует выживанию как самих *Lpb. plantarum*, так и сопутствующей культуры *Str. thermophilus*.

Капсулированная форма отличается более высокой плотностью клеток, чем у свободной культуры. Плотность колоний высокая и более равномерная при всех трех соотношениях. Даже при минимальной дозе внесения пробиотика (1,5 %) плотность колоний остаётся достаточно высокой. Популяция микроорганизмов является более стабильной, так как защищена от резких изменений среды.

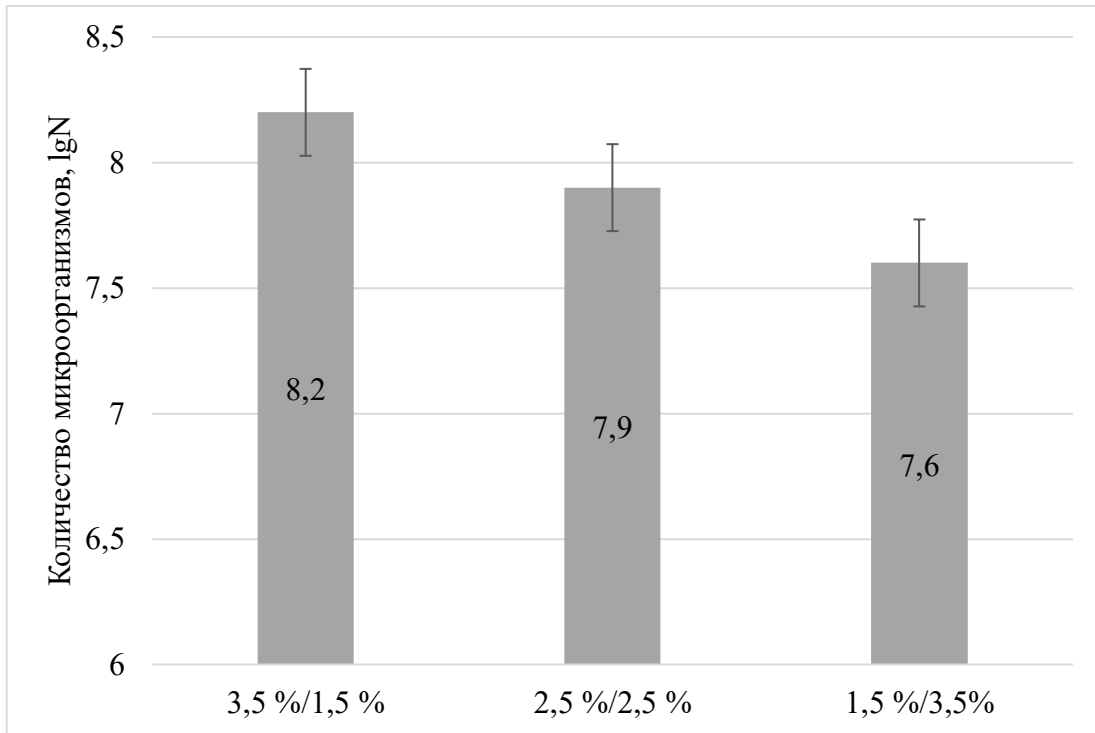


Рисунок 4.11 – Количественный учет микроорганизмов в образцах с *Lpb. plantarum/A2* и *Str. thermophilus* на 18 сутки хранения

Капсулирование не просто сохраняет, а увеличивает вероятность того, что на конец срока годности количество живых клеток *Lpb. plantarum* будет гарантированно превышать минимальный порог 10^6 – 10^7 КОЕ/см³ [207], даже после длительного хранения.

Ключевой проблемой производства пробиотических продуктов является неконтролируемое нарастание кислотности в процессе хранения (постокисление), ведущее к ухудшению вкуса и снижению потребительских свойств. Исследование динамики кислотообразования (таблицы 4.10 и 4.12) показало, что использование соотношения с преобладанием *Str. thermophilus* позволяет замедлить темпы нарастания титруемой кислотности. В то время как образцы с высоким содержанием *Lpb. plantarum* превышают нормативную кислотность (120 °Т) уже к 6-м суткам, образец с доминированием стрептококка достигает этого порога лишь к 12-м суткам, оставаясь в пределах допустимых значений на протяжении 9 суток

(таблица 4.12). Это обеспечивает более длительное сохранение мягкого, сбалансированного вкуса продукта без риска постокисления.

Преобладание *Str. thermophilus*, обладающего умеренной кислотообразующей активностью, создает щадящие условия для постепенного высвобождения клеток *Lpb. plantarum* из микрокапсул. Более высокие значения рН при этом соотношении на начальных этапах хранения предотвращают стресс пробиотической культуры, вызванный повышенной кислотностью среды, при ее выходе из капсулы и способствуют более равномерному распределению метаболитов в объеме продукта.

Использование *Str. thermophilus* в качестве доминирующей заквасочной микрофлоры обеспечивает формирование стабильного белкового сгустка с прогнозируемыми реологическими параметрами. Хотя максимальная вязкость достигается при преобладании палочковой культуры, образец с соотношением 1,5% *Lpb. plantarum*/3,5% *Str. thermophilus* демонстрирует достаточную вязкость (643 мПа·с, таблица 4.8) для сохранения товарного вида, при этом структура продукта является более эластичной и менее подвержена разрушению при механическом воздействии (фасовка, транспортировка) за счет экзополисахаридов, продуцируемых стрептококком.

Соотношение 1,5% *Lpb. plantarum*/3,5% *Str. thermophilus* является оптимальным с технологической точки зрения, т.к. обеспечивает стабильность продукта в течение длительного срока хранения, сохранение заданного уровня пробиотических микроорганизмов и высокие органолептические показатели, что отвечает требованиям промышленного производства функциональных продуктов питания.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР ПРОБИОТИКОВ

5.1 Обоснование параметров технологического процесса производства кисломолочного продукта

Производство разработанного кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков предлагается резервуарным способом в соответствии с принципиальной схемой, показанной на рисунке 5.1, рецептура представлена в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Рецептура кисломолочного продукта

Наименование сырья	Расход сырья, кг
Молоко нормализованное (массовая доля жира 2,7%)	950,0
Закваска <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> на обезжиренном молоке	35,0
Закваска <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (капсулированная форма) на обезжиренном молоке	15,0
Итого	1000,0

Технология производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков включает следующие этапы:

1. Проводят приемку и входной контроль молочного сырья, выполняют его очистку от загрязнений и примесей. Качество молочного сырья должно соответствовать требованиям Технического регламента Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013 [207]. Для производства кисломолочного продукта используют молоко не ниже второго сорта, кислотностью не более 19 °Т, плотностью не менее 1027 кг/м³ [125].

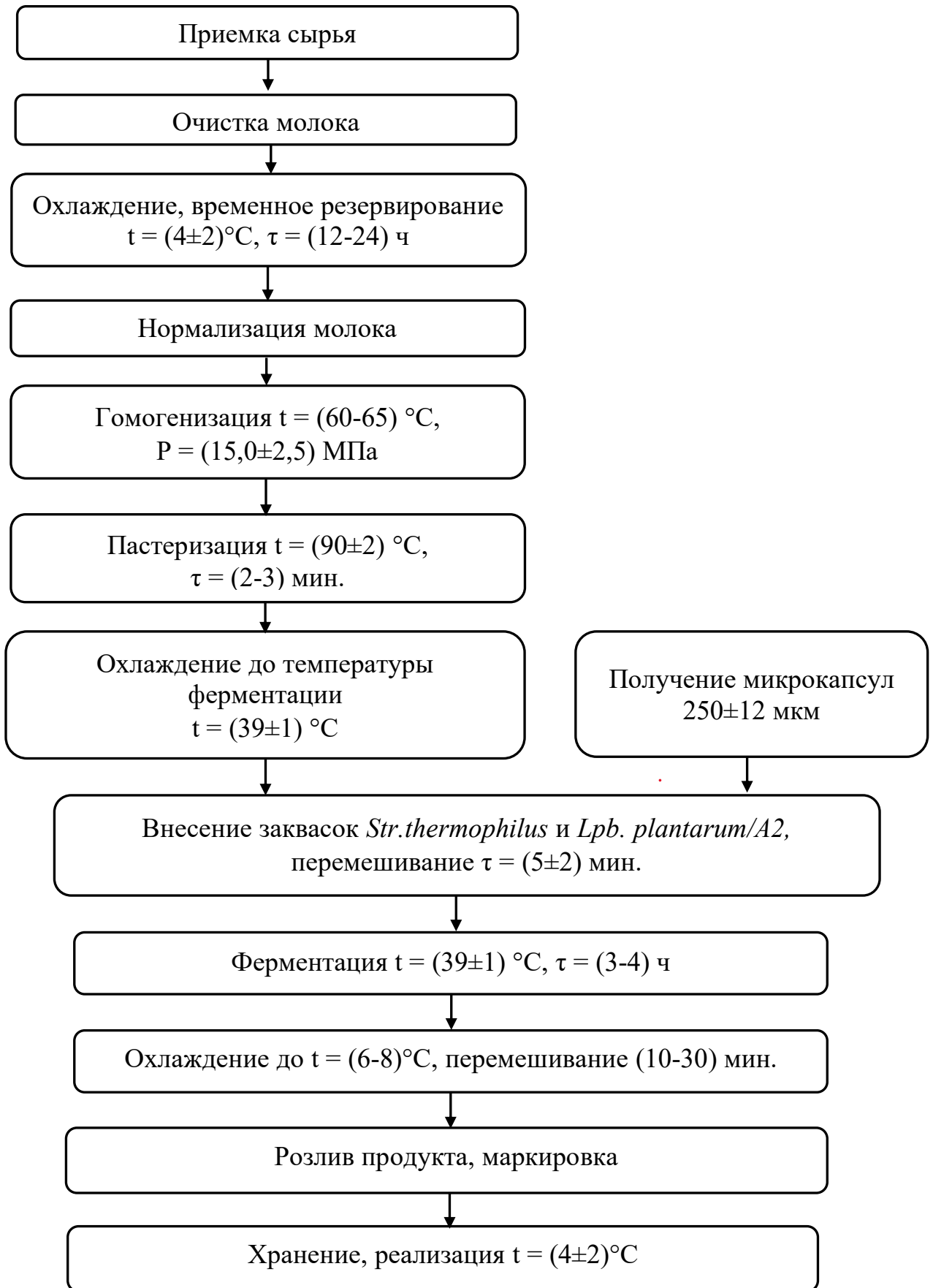


Рисунок 5.1 – Принципиальная схема производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков

2. Очистку молока проводят при температуре поступления молока на предприятие. Основной целью очистки холодного молока является удаление различных механических примесей, которые загрязняют молоко, а также продление бактерицидной фазы.

3. Очищенное молоко охлаждают до температуры (4 ± 2) °С и направляют на резервирование. Охлаждение молока до пастеризации обеспечивает продление бактерицидной фазы и предотвращает его микробиологическую порчу. Хранение охлажденного, не пастеризованного молока допускается в течение не более 24 часов.

4. Нормализация происходит в потоке на сепараторе нормализаторе. Гомогенизацию проводят при температуре $(60-65)$ °С и давлении $(15,0\pm 2,5)$ МПа [208].

5. С целью подавления жизнедеятельности патогенной микрофлоры, а также для осуществления теплового воздействия на белковую систему молока проводят пастеризацию при температуре (90 ± 2) °С с выдержкой 2-3 минуты.

6. Затем молоко охлаждают до температуры сквашивания (39 ± 1) °С и направляют в резервуар. Заквашивают молоко в резервуаре для кисломолочных продуктов с охлаждающей рубашкой и мешалкой. Закваски вносят в количестве $5\pm 0,25$ % от общего объема смеси в соотношении 1,5 % *Lpb.plantarum/A2* (микрокапсулы размером 250 ± 12 мкм, полученные при частоте подачи смеси 24,5 Гц и скорости вращения привода диспергатора 1600 об/мин.) и 3,5 % *Str.thermophilus*. Для лучшего перемешивания молока с закваской заполнение резервуара производят при включенной мешалке. Перемешивание заканчивают через (5 ± 2) минут после заполнения резервуара. Сквашивание проводят при температуре (39 ± 1) °С в течение 3-4 часов до достижения кислотности (85 ± 5) °Т.

7. По окончании сквашивания сначала подают ледяную воду в течение 30–60 минут, а затем сгусток перемешивают. Продолжительность перемешивания составляет 10–30 минут. Охлаждают готовый продукт до температуры 6–8 °С.

8. Затем кисломолочный продукт расфасовывают, охлаждают до (4 ± 2) °С.

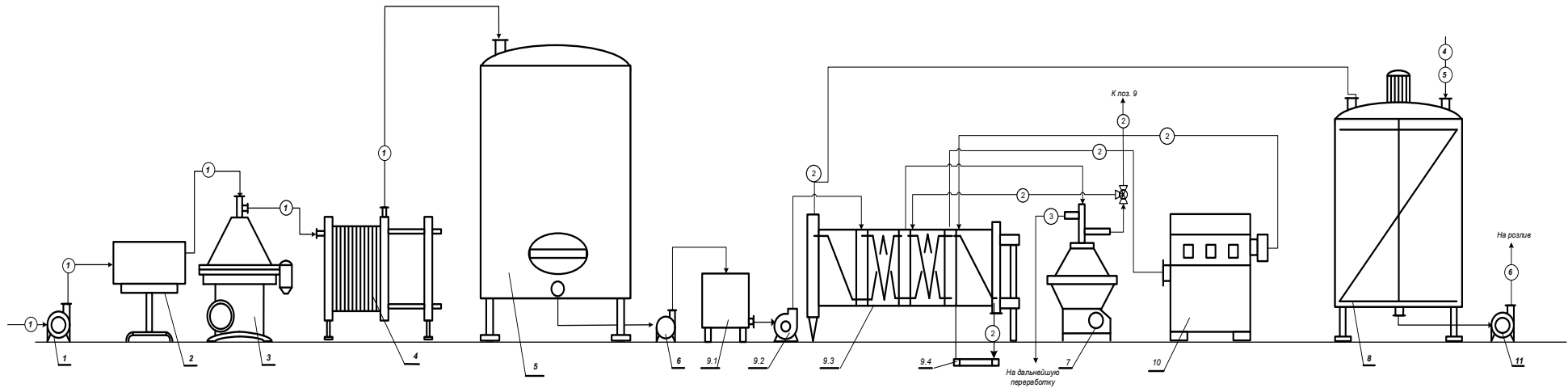
9. Хранение до реализации проводят в холодильных камерах при температуре (4 ± 2) °С и влажности 85–90 % в условиях строгого санитарно-гигиенического режима. Готовый продукт имеет кислотность (85 ± 5) °Т и выпускается с предприятия при температуре не выше 6 °С после оценки качества. Проведенные исследования показали, что разработанный продукт на 12 сутки соответствует требованиям ГОСТ 32923-2014 по уровню титруемой кислотности, органолептическим и микробиологическим показателям. С учетом коэффициента запаса срок годности кисломолочного продукта установлен равным 8 суток.

Для составления аппаратурно-процессовой схемы необходимо в соответствии с принципиальной схемой выработки продукта подобрать типы оборудования, которое потребуются для осуществления каждой технологической операции. Технологический процесс производства кисломолочного продукта осуществляется на оборудовании, приведенном в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Технологическое оборудование для производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков

№ п/п	Технологическая операция	Наименование оборудования	Марка
1.	Приемка сырья	Насос центробежный	ОНЦ-12,5/20 Ермак
2.	Очистка молока	Сепаратор-молокоочиститель	Ж5-Плава-ОО-15
3.	Охлаждение, временное резервирование	Охладитель	ООЛ-15
		Емкость для хранения молока	Резервуар ОМВ-10
4.	Нормализация молока	Сепаратор-нормализатор	Ж5-Плава-ОС-5
5.	Гомогенизация	Гомогенизатор	А1-ОГ2М
6.	Пастеризация	Пастеризационно-охладительная установка	А1-ОПК-5
7.	Ферментация	Емкостной аппарат	Я1-ОСВ-5
8.	Розлив продукта, маркировка	Автомат фасовочный	FL-200
9.	Хранение, реализация	Холодильная камера	ХК-60

На рисунке 5.2 представлена аппаратурно-процессовая схема технологической линии производства кисломолочного продукта.



**Условные обозначения
оборудования:**

- 1 - Насос центробежный ОНЦ 12,5/20 "Ермак"
- 2 - Станция учета и приемки молока
- 3 - Сепаратор холодной очистки молока Ж5-Плава-ОО-15
- 4 - Охладитель ООЛ-15
- 5 - Резервуар ОМВ-10
- 6 - Насос центробежный Г2-ОПА
- 7 - Сепаратор-нормализатор Ж5-Плава-ОС-5
- 8 - Емкостной аппарат Я1_ОСВ-5
- 9 - Пастеризационная установка А1-ОПК-5
- 10 - Гомогенизатор А1-ОГ2М
- 11 - Насос роторный НРМ-2

Условные обозначения потоков:

- ① - Молоко - сырое
- ② - Молоко м.д.ж. 3,2 %
- ③ - Сливки жирностью 8,4 %
- ④ - *Str. thermophilus*
- ⑤ - *Lpb. plantarum/A2*
- ⑥ - Кисломолочный биопродукт

Рисунок 5.2 – Аппаратурно-процессовая схема производства кисломолочного продукта

5.2 Определение рисков и критических контрольных точек разработанной технологии

Ужесточение требований технических регламентов к показателям качества и безопасности пищевых продуктов актуализирует внедрение на предприятиях системы менеджмента безопасности на основе принципов ХАССП. В данных условиях организация лабораторного контроля становится обязательным этапом технологической подготовки производства новых наименований продукции [209].

В мировой практике система ХАССП утвердилась в качестве универсальной модели обеспечения безопасности пищевых производств. Основу системы составляет идентификация критических контрольных точек – этапов технологического процесса, параметры которых оказывают наиболее существенное влияние на безопасность выпускаемой продукции.

В рамках диссертационной работы проведен анализ опасных факторов, которые могут возникнуть при производстве разработанного кисломолочного продукта (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Виды опасностей и опасные факторы при производстве разработанного кисломолочного продукта

Наименование видов опасностей	Опасный фактор	Источник информации
1	2	3
Биологические	Бактерии группы кишечных палочек (БГКП, колиформы)	ТР ТС 033/2013
	Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Дрожжи и плесени	
	Микроорганизмы порчи (психротрофные, маслянокислые)	

Продолжение таблицы 5.3

1	2	3
Химические	Токсичные элементы: свинец (Pb), мышьяк (As), кадмий (Cd), ртуть (Hg)	ТР ТС 033/2013
	Антибиотики: левомецетин (хлорамфеникол), тетрациклиновая группа, стрептомицин, пенициллин	
	Микотоксины (афлатоксин M ₁)	
	Ингибирующие вещества	
	Остаточные количества моющих и дезинфицирующих средств	
	Пестициды (гексахлорциклогексан, ДДТ и его метаболиты)	
	Радионуклиды (цезий-137, стронций-90)	
Физические	Механические примеси	ТР ТС 033/2013
	Металлическая стружка, частицы износа оборудования	
	Инородные тела (стекло, пластик, песок)	
Аллергенные	Белки коровьего молока (β -лактоглобулин, α -лактальбумин)	ТР ТС 033/2013

При производстве разработанного кисломолочного продукта с микроинкапсулированной культурой *Lpb. plantarum* идентифицированы четыре критические контрольные точки (таблица 5.4).

Первая ККТ (ККТ-1) установлена на этапе пастеризации молока. На данном этапе существует риск выживания патогенной и условно-патогенной микрофлоры вследствие несоблюдения температурно-временных параметров обработки (температура, время выдержки), что регламентируется требованиями ТР ТС 033/2013 и технологической инструкции. Контроль осуществляется непрерывно с использованием автоматических регистрирующих приборов.

Вторая ККТ (ККТ-2) установлена на этапе внесения микроинкапсулированных пробиотических культур. Риски связаны со

снижением активности заквасок (менее 1×10^9 КОЕ/см³), повреждением капсульной оболочки, а также неравномерным дозированием, что непосредственно влияет на пробиотические свойства и стабильность продукта в процессе хранения.

Третья ККТ (ККТ-3) установлена на этапе ферментации (сбраживания). Имеются риски развития посторонней микрофлоры, ингибирования заквасочных культур и нарушения процесса структурообразования вследствие отклонения температуры (39 ± 1 °С) или продолжительности сбраживания, а также недостижения целевого значения рН ($5,1 \pm 0,1$), что обосновано экспериментальными данными главы 4.

Четвертая ККТ (ККТ-4) установлена на этапе фасовки и укупорки готового продукта. Риски вторичной контаминации, нарушения герметичности упаковки и попадания инородных включений контролируются посредством автоматических систем контроля герметичности и микробиологического мониторинга смывов с оборудования.

Для каждой идентифицированной критической контрольной точки определены критические пределы – регламентированные значения контролируемых параметров, обеспечивающие гарантированную безопасность готовой продукции.

При производстве разработанного кисломолочного продукта к числу критических пределов отнесены: температурно-временные параметры пастеризации; температура и продолжительность ферментации; значение активной кислотности (рН) на завершающей стадии сбраживания; показатели активности и чистоты вносимых пробиотических культур; параметры герметичности потребительской упаковки.

Таблица 5.4 – Определение критических контрольных точек (ККТ) при производстве разработанного кисломолочного продукта

№ п/п	Технологическая операция	Опасный фактор	Ответ на вопросы 1–4 по дереву принятия решений*	ККТ (да/нет)
1	2	3	4	5
1.	Приемка молока-сырья	Б: патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, листерии), БГКП; Х: антибиотики, ингибиторы, афлатоксин М ₁ , тяжелые металлы; Ф: механические примеси	В1: Да (контроль возможен) В2: Да (опасность значимая) В3: Нет (последующие этапы – пастеризация – устраняют биологические риски; химические и физические – не устраняются)	НЕТ
2.	Хранение молока ($t = 4 \pm 2$ °С), $\tau = 12-24$ ч	Б: развитие психротрофной микрофлоры	В1: Да (контроль температуры) В2: Нет (низкая вероятность при соблюдении режимов)	НЕТ
3.	Пастеризация ($t = 90 \pm 2$ °С, $\tau = 2-3$ мин.)	Б: выживание патогенной микрофлоры	В1: Да (контроль параметров) В2: Да (высокая значимость) В3: Да (устраняет опасность) В4: Да (недопустимый риск без контроля)	ККТ-1
4.	Охлаждение до температуры ферментации (39 ± 1 °С)	Б: вторичная контаминация; Ф: нарушение герметичности	В1: Да (контроль возможен) В2: Нет (низкая вероятность при исправном оборудовании)	НЕТ

Продолжение таблицы 5.4

1	2	3	4	5
5.	Внесение микроинкапсулированного <i>Lpb. plantarum</i> и <i>Str. thermophilus</i>	Б: низкая активность заквасок, контаминация посторонней микрофлорой; Ф: повреждение капсул, неравномерное дозирование	В1: Да (входной контроль, контроль дозирования) В2: Да (высокая значимость) В3: Да (управляется на данном этапе) В4: Да (недопустимый риск)	ККТ-2
6.	Ферментация ($t = 39 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,1 \pm 0,1$, $\tau = 3\text{-}4 \text{ ч до } (85 \pm 5) \text{ }^\circ\text{T}$)	Б: развитие посторонней микрофлоры, ингибирование заквасок; Х: накопление нежелательных метаболитов	В1: Да (контроль параметров) В2: Да (высокая значимость) В3: Да (управляется на данном этапе) В4: Да (недопустимый риск)	ККТ-3
7.	Перемешивание и охлаждение (до $6\text{--}8 \text{ }^\circ\text{C}$)	Б: вторичная контаминация, замедленное охлаждение → рост остаточной микрофлоры	В1: Да (контроль скорости охлаждения) В2: Нет (управляется ППУ при соблюдении режимов)	НЕТ
8.	Фасовка и укупорка	Б: вторичная контаминация; Ф: нарушение герметичности, инородные тела	В1: Да (контроль герметичности, микробиологический контроль) В2: Да (высокая значимость) В3: Да (управляется на данном этапе) В4: Да (недопустимый риск)	ККТ-4
9.	Хранение готовой продукции ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	Б: постацидификация, рост остаточной микрофлоры	В1: Да (контроль температуры) В2: Нет (управляется ППУ)	НЕТ

В рабочих листах ХАССП представлены идентифицированные ККТ разработанной технологии, их критические пределы, а также предупреждающие и корректирующие действия, обеспечивающие управление безопасностью продукта на всех этапах производства.

Разработанная итоговая карта контроля ХАССП (Приложение И) в полной мере охватывает все 4 критические контрольные точки, идентифицированные при производстве кисломолочного продукта с микроинкапсулированной культурой *Lpb. plantarum*. Установленные критические пределы научно обоснованы и базируются на требованиях технических регламентов, действующей нормативной документации и результатах собственных экспериментальных исследований.

5.3 Оценка экономической эффективности производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков

Расчет экономической эффективности от внедрения разработанной технологии производства кисломолочного продукта с микроинкапсулированной культурой *Lactiplantibacillus plantarum* выполнен на основании калькуляции себестоимости готовой продукции, норм расхода сырья и материалов, установленных технологической инструкцией, а также действующих отраслевых нормативов для предприятий молочной промышленности (Приложение К).

Себестоимость продукции рассчитана на 1 тонну и на единицу готовой продукции (стаканчик 200 г).

Результаты экономических расчетов представлены в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Основные экономические показатели производства кисломолочного продукта по традиционной технологии (со свободной культурой) и с использованием микроинкапсулированных пробиотических культур

Показатель	Ед. изм.	Технология со свободной культурой <i>Lpb. plantarum</i>	Разработанная технология (с микроинкапсулированной <i>Lpb. plantarum/A2</i>)
Годовой объем производства	т	300	300
Полная себестоимость 1 т	руб.	105 869,3	112 584,8
Оптовая цена за 1 т*	руб.	130 000,0	150 000,0
Затраты на 1 рубль товарной продукции	руб.	0,81	0,75
Прибыль от реализации 1 т продукции	руб.	24 130,7	37 415,2
Рентабельность производства	%	22,8	33,2

*Для разработанной технологии применена премиальная оптовая цена, обоснованная уникальными потребительскими свойствами продукта.

Проведенный экономический анализ, позволяет сделать следующие выводы относительно целесообразности внедрения разработанной биотехнологии кисломолочного продукта с микроинкапсулированными культурами пробиотиков.

Объективное удорожание себестоимости. Производство продукта с использованием микроинкапсулированной формы *Lpb. plantarum/A2* характеризуется более высокой полной себестоимостью (112 584,8 руб./т) по сравнению с контролем (105 869,3 руб./т). Увеличение себестоимости на 6 715,5 руб./т (или на 6,3%) обусловлено исключительно использованием более дорогого инновационного ингредиента – капсулированной пробиотической закваски, стоимость которой включает в себя затраты на процесс микроинкапсулирования (материалы, сублимационную сушку, дополнительное оборудование для получения микрокапсул).

Несмотря на более высокую себестоимость, разработанный продукт обладает рядом доказанных уникальных преимуществ, которые отсутствуют у контроля:

- Пролонгированный срок годности: Сохранение нормативной кислотности (ниже 120 °Т) в течение 8 суток против 3 суток у контроля, что снижает логистические риски и расширяет географию продаж.
- Гарантированная пробиотическая активность: Выживаемость целевого пробиотика *Lpb. plantarum* к концу срока хранения в 3 раза выше, чем в контроле ($3,5 \times 10^7$ КОЕ/г против $1,1 \times 10^7$ КОЕ/г).
- Защита в желудочно-кишечном тракте: экспериментально подтвержденная высокая выживаемость инкапсулированных клеток в условиях *in vitro*, имитирующих среду ЖКТ.

Эти характеристики позволяют позиционировать продукт в премиальном ценовом сегменте. При обоснованном увеличении оптовой цены до 150 000 руб./т (что на 15% выше цены стандартного продукта), экономические показатели разработанной технологии становятся существенно лучше контрольных.

Затраты на 1 рубль товарной продукции снижаются с 0,81 руб. до 0,75 руб., что свидетельствует о более эффективном использовании ресурсов в расчете на единицу стоимости готовой продукции.

Прибыль на 1 тонну возрастает на 13 284,5 руб. и составляет 37 415,2 руб., что на 55% выше прибыли от реализации продукта со свободной культурой.

Рентабельность производства достигает 33,2%, превышая показатель контроля (22,8%) более чем на 10 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании анализа научно-технической литературы обоснован выбор объектов исследования: пробиотической культуры *Lactiplantibacillus plantarum* БИМ-В 492, обладающей высокой кислотоустойчивостью; альгината натрия, обеспечивающего формирование стабильных и биосовместимых оболочек; заквасочной культуры *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, широко применяемой в молочной промышленности.

2. Экспериментально обоснованы технологические параметры получения микрокапсул с *Lpb. plantarum* методом экструзии на капсуляторе ИИ 0,35-1,5. Установлено, что изменение скорости вращения диспергатора от 900 до 2000 об/мин. при постоянной частоте подачи дисперсной системы (24,5 Гц) позволяет получать сублимированные микрокапсулы среднего размера от 400 ± 20 до 200 ± 10 мкм. Подтверждено, что уменьшение размера капсул сопровождается снижением производительности процесса (с 5,53 до 2,35 г/мин.) и увеличением потерь дисперсной системы (с 280 до 550 мл).

3. Выявлена корреляция между размером микрокапсул, их физико-химическими свойствами и жизнеспособностью инкапсулированной культуры. Доказано, что с уменьшением размера микрокапсул с 400 мкм до 200 мкм происходит снижение содержания жизнеспособных клеток *Lpb. plantarum* с $2,4 \times 10^8$ до $0,8 \times 10^7$ КОЕ/см³; увеличение содержания кальция в оболочке с 0,39 до 0,58 г/г капсул и снижение содержания альгината с 0,57 до 0,38 г/г, что приводит к формированию более жесткой сшитой структуры; повышение термостабильности, подтвержденное ростом энергии активации термодеструкции (E_a) с 48 до 113 кДж/моль; увеличение насыпной плотности с 270 до 480 кг/м³, что улучшает технологические свойства порошкообразного продукта.

4. Экспериментально подтверждено, что процесс микрокапсулирования вызывает у *Lpb. plantarum* адаптивные метаболические реакции. В

микрокапсулах, в отличие от свободной культуры, синтезируются ненасыщенные жирные кислоты (октадекановая, гексадекановая), концентрация которых возрастает с уменьшением размера капсул (до 4,93 мкг/мл в капсулах 200 мкм). Установлено, что состав вторичных метаболитов в капсулах формирует отдельный кластер, отличающийся от метаболического профиля свободной культуры.

5. Исследованы закономерности совместного культивирования *Str. thermophilus* и *Lpb. plantarum*. Определены оптимальные параметры ферментации для получения кисломолочного продукта: температура (39 ± 1) °С, суммарная доза внесения заквасок – $5 \pm 0,25$ % от общего объема смеси в соотношении 1,5 % *Lpb.plantarum/A2* и 3,5 % *Str.thermophilus*; продолжительность сквашивания 4 часа.

6. Проведено сравнительное исследование влияния формы пробиотика (свободная и капсулированная) на процесс ферментации и свойства готового продукта. Установлено, что использование капсулированной формы *Lpb.plantarum/A2* позволяет контролировать процесс кислотообразования; способствует формированию более плотного и стабильного сгустка; обеспечивает высокую выживаемость на протяжении всего срока хранения.

7. Установлено преимущество использования капсулированной формы *Lpb.plantarum/A2* для увеличения срока годности кисломолочного продукта. Показано, что продукты, ферментированные культурой в свободной форме, достигают предельной титруемой кислотности 120 °Т, установленной ГОСТ 32923-2014 на 3-6 сутки хранения, в то время как при использовании капсулированной формы кислотность нарастает в указанных в пределах до 12 суток, при содержании молочнокислых микроорганизмов $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г.

8. Разработана научно обоснованная технология производства кисломолочного продукта функционального назначения с использованием микроинкапсулированных пробиотических культур.

9. На основе анализа рисков по системе ХАССП идентифицированы 4 критические контрольные точки (ККТ) и установлены критические пределы контролируемых параметров, гарантирующие безопасность готовой продукции.

10. Анализ экономической эффективности разработанной биотехнологии позволил установить, что применение микроинкапсулированной формы *Lpb. plantarum/A2* увеличивает полную себестоимость продукта на 6,3%, что обусловлено стоимостью инновационного ингредиента. Вместе с тем, доказанные уникальные преимущества продукта и реализация стратегии премиального ценообразования позволяет нивелировать рост себестоимости и обеспечить прирост прибыли на 55 % относительно контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doyon, M. Functional foods: a conceptual definition / M. Doyon, J. Labrecque // *British Food Journal*. – 2008. – Vol. 110. – P. 113–149. – URL: <https://doi.org/10.1108/00070700810918036>.
2. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill, F. Guarner, G. Reid [et al.] // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2014. – Vol. 11. – P. 506–514. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
3. Clavijo, V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review / V. Clavijo, M. J. Vives Florez // *Poultry Science*. – 2018. – Vol. 97. – P. 1006–1021. – URL: <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>.
4. Zhang, C. X. Interactions between intestinal microflora/probiotics and the immune system / C. X. Zhang, H. Y. Wang, T. X. Chen // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 6764919. – URL: <https://doi.org/10.1155/2019/6764919>.
5. Protective and ameliorating effects of probiotics against diet-induced obesity: A review / C. Tang, L. Kong, M. Shan [et al.] // *Food Research International*. – 2021. – Vol. 147. – P. 110490. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110490>.
6. *Lactobacillus sakei* alleviates high-fat-diet-induced obesity and anxiety in mice by inducing AMPK activation and SIRT1 expression and inhibiting gut microbiota-mediated NF- κ B activation / H.-M. Jang, S.-K. Han, J.-K. Kim [et al.] // *Molecular Nutrition & Food Research*. – 2019. – Vol. 63. – P. 1800978. – URL: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800978>.
7. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88 / L. Zhang, C. Liu, D. Li [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – Vol. 54. – P. 270–275. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037>.

8. Tripathi, M. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage / M. K. Tripathi, S. K. Giri // *Journal of Functional Foods*. – 2014. – Vol. 9. – P. 225–241. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.
9. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices / C. P. Champagne, R. P. Ross, M. Saarela [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2011. – Vol. 149. – P. 185–193. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>.
10. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system / T. Huq, A. Khan, R. A. Khan [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2013. – Vol. 53. – P. 909–916. – URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.573152>.
11. Zhang, Y. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein pectin layers / Y. Zhang, J. Lin, Q. Zhong // *Food Research International*. – 2015. – Vol. 71. – P. 9–15. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>.
12. Recent advances in the design and fabrication of probiotic delivery systems to target intestinal inflammation / Z. Jiang, M. Li, D. J. McClements [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2022. – Vol. 125. – P. 107438. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107438>.
13. Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers / J. Agudelo, A. Cano, C. Gonzalez-Martinez, A. Chiralt // *Journal of Functional Foods*. – 2017. – Vol. 37. – P. 416–423. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.014>.
14. Formation of soy protein isolate carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and in vitro digestion / L. Mao, Q. Pan, F. Yuan, Y. Gao // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 276. – P. 307–314. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.026>.
15. Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi maize / G. Poletto, G. C. Raddatz, A. J. Cichoski [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – Vol. 95. – P. 238–244. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.049>.

16. Markowiak, P. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health / P. Markowiak, K. Slizewska // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9. – P. 1021. – URL: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>.
17. Misra, S. Novel approaches for co encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review / S. Misra, P. Pandey, H. N. Mishra // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 109. – P. 340–351. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>.
18. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods / G. Frakolaki, V. Giannou, D. Kekos, C. Tzia // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2021. – Vol. 61. – P. 1515–1536. – URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>.
19. Reque, P. M. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry / P. M. Reque, A. Brandelli // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 114. – P. 1–10. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>.
20. Lappalainen, R. A pan European survey of consumer attitudes to food, nutrition and health: an overview / R. Lappalainen, J. Kearney, M. Gibney // *Food Quality and Preference*. – 1998. – Vol. 9. – P. 467–478.
21. Ogden, J. *Health Psychology, A Text Book* / J. Ogden. – Trowbridge : Open University Press, 1998.
22. Bellisle, F. Functional food science and behaviour and physiological functions / F. Bellisle, J. E. Blundell, L. Dye // *British Journal of Nutrition*. – 1998. – Vol. 80. – P. 173–193.
23. Roberfroid, M. B. What is beneficial for health? The concept of functional food / M. B. Roberfroid // *Food and Chemical Toxicology*. – 1999. – Vol. 37. – P. 1039–1041.
24. Hardy, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning / G. Hardy // *Nutrition*. – 2000. – Vol. 16. – P. 688–697.
25. Kwak, N. S. Functional foods part 2 the impact on current regulatory terminology / N. S. Kwak, D. J. Jukes // *Food Control*. – 2001. – Vol. 12. – P. 109–117.

26. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document / A. T. Diplock, P. J. Agget, M. Ashwell [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 1999. – Vol. 81. – P. 1–27.
27. FAO/WHO. *Codex Alimentarius*. – 2nd ed. – Rome : FAO, 1994. – Vol. 4.
28. Суюнчева, Б.О. Концентрат молочной сыворотки, обогащенный незаменимыми нутриентами / Б.О. Суюнчева, Е.С. Мизирева, Р.Э. Григорян, С.В. Лодыгина, А.Г. Храпцов // *Молочная промышленность*. – 2015. – № 2. – С. 46.
29. Chahal, S. P. Lactic Acid / S. P. Chahal // *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. – Berlin : VCH, Verlag, 1989.
30. Moldes, A. B. Cogeneration of cellobiose and glucose from pretreated wood and bioconversion to lactic acid / A. B. Moldes, J. L. Alonso, J. C. Parajó // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 1999. – Vol. 87. – P. 787–792.
31. Technological and health benefits of dairy starter cultures / C. Daly, G. F. Fitzgerald, L. O'Connor, R. Davis // *Indian Dairy Journal*. – 1998. – Vol. 8. – P. 195–205.
32. Use of response surface methodology to evaluate variables affecting the growth and acidification characteristics of yoghurt cultures / S. Torriani, F. Gardini, M. E. Guerzoni, F. Dellaglio // *International Dairy Journal*. – 1996. – Vol. 6. – P. 625–636.
33. Spinnler, H. E. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement / H. E. Spinnler, G. Corrieu // *Journal of Dairy Research*. – 1989. – Vol. 56. – P. 755–764.
34. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133; experimental data and model development / M. Boonmee, N. Leksawasdi, W. Bridge, L. P. Rogers // *Biochemical Engineering Journal*. – 2003. – Vol. 14. – P. 127–135.
35. Ray, B. The need for biopreservation / B. Ray // *Food Biopreservatives of Microbial Origin* / ed. by B. Ray, M. Daeschel. – Boca Raton : CRC Press, 1992. – P. 1–24.
36. Wood, J. B. J. *The Genera of Lactic Acid Bacteria* / J. B. J. Wood, W. H. Holzaphel. – London : Blackie Academic and Professional, 1995.

37. Wood, J. B. J. *Microbiology of Fermented Foods* / J. B. J. Wood. – London : Blackie Academic and Professional, 1997.
38. Caplice, E. Food fermentations, Role of microorganisms in food production and preservation / E. Caplice, G. F. Fitzgerald // *International Journal of Food Microbiology*. – 1999. – Vol. 50. – P. 131–149.
39. Driessen, F. M. *Technology of Mesophilic Fermented Milk* / F. M. Driessen, Z. Puhán // *Bulletin of the IDF*. – 1988. – No. 227. – P. 75–80.
40. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* biosurfactant proteins by Protein Chip tandem mass spectrometry tryptic peptide sequencing / G. Reid, B. S. Gan, Y. M. She [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68. – P. 977–980.
41. Temmerman, R. Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods / R. Temmerman, G. Huys, J. Seings // *Trends in Food Science & Technology*. – 2004. – Vol. 15. – P. 348–359.
42. Servin, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens / A. L. Servin // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – Vol. 28, No. 4. – P. 405–440.
43. Auclair, J. *Cultured milk* / J. Auclair, G. Mocquot // *Milk products in the future* / ed. by J. Rothwell. – UK : Society of Dairy Technology, 1974. – P. 33–36.
44. Sandine, W. E. *The streptococci: Milk products* / W. E. Sandine // *Bacterial Starter Cultures for Foods*. – Boca Raton : CRC Press, 1985. – P. 25–40.
45. Narvhus, J. A. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks / J. A. Narvhus, T. H. Gadaja // *International Journal of Food Microbiology*. – 2003. – Vol. 86. – P. 51–60.
46. Hugenholtz, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria / J. Hugenholtz // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1993. – Vol. 12. – P. 165–178.
47. Fuller, R. *Probiotics in Man and Animals* / R. Fuller // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1989. – Vol. 66. – P. 365–378.
48. Deeth, H. C. *Yoghurt: Nutritive value and therapeutic aspects* / H. C. Deeth, A. Y. Tamime // *Journal of Food Protection*. – 1981. – Vol. 44. – P. 78–86.

49. Kawamura, T. A clinical study on a *Lactobacillus casei* preparation (LBG-01) in patients with chronic irregular bowel movement and abdominal discomfort / T. Kawamura, K. Ohnuki, H. Ichida // *Japanese Pharmacology and Therapeutics*. – 1981. – Vol. 9. – P. 4361–4370.
50. Lambert, J. Upper gastrointestinal tract disease and probiotics / J. Lambert, R. R. Rand Hull // *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. – 1996. – Vol. 5. – P. 31–35.
51. Microbes from raw milk for fermented dairy products / J. T. M. Wouters, E. H. E. Ayad, J. Hugenholtz, G. Smith // *International Dairy Journal*. – 2002. – Vol. 12. – P. 91–109.
52. Poupard, J. A. Biology of the bifidobacteria / J. A. Poupard, J. Hussain, R. F. Morris // *Bacteriological Reviews*. – 1973. – Vol. 37. – P. 136–165.
53. Bulletin of the International Dairy Federation. Fermented Milks Science and Technology. – 1988. – Doc No. 227.
54. Ziemer, J. C. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies / J. C. Ziemer, G. R. Gibson // *International Dairy Journal*. – 1998. – Vol. 8. – P. 473–479.
55. Rao, A. V. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices / A. V. Rao, N. Shiwnarain, I. Maharaj // *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. – 1989. – Vol. 22. – P. 345–349.
56. Steenson, L. R. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages / L. R. Steenson, T. R. Klaenhammer, H. E. Swaisgood // *Journal of Dairy Science*. – 1987. – Vol. 70. – P. 1121–1127.
57. Prete, R. Genotypic and Phenotypic Characterization of Food-Associated *Lactobacillus Plantarum* Isolates for Potential Probiotic Activities / R. Prete, S.L. Long, S.A. Joyce, A. Corsetti // *FEMS Microbiology Letters*. – 2020. – Vol. 367. – fnaa076.
58. Al-Tawaha, R. Potential Benefits of *Lactobacillus Plantarum* as Probiotic and Its Advantages in Human Health and Industrial Applications: A Review / R. Al-Tawaha, C. Meng // *Advances in Environmental Biology*. – 2018. – Vol. 12. – P. 16–27.

59. Shahidi, F. Bioaccessibility and Bioavailability of Phenolic Compounds / F. Shahidi, H. Peng // *Journal of Food Bioactives*. – 2018. – Vol. 4. – P. 11–68.
60. Huang, R. An Overview of the Perception and Mitigation of Astringency Associated with Phenolic Compounds / R. Huang // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2021. – Vol. 20. – P. 1036–1074.
61. Kearney, L. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium alginate beads / L. Kearney, M. Upton, A. Loughlin // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – Vol. 56. – P. 3112–3116.
62. Sheu, T. Y. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels / T. Y. Sheu, R. T. Marshall // *Journal of Food Science*. – 1993. – Vol. 54. – P. 557–561.
63. Sung, H. H. Enhancing survival of lactic acid bacteria in ice cream by natural encapsulation / H. H. Sung // *Dissertation Abstracts International*. – 1997. – Vol. 13. – P. 5407.
64. Wandrey, C. Materials for Encapsulation / C. Wandrey, A. Bartkowiak, S. E. Harding // *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* / ed. by N. J. Zuidam, V. A. Nedovic. – Dordrecht : Springer, 2009. – P. 31–100.
65. Fang, Z. Encapsulation of polyphenols – a review / Z. Fang, B. Bhandari // *Trends in Food Science & Technology*. – 2010. – Vol. 21. – P. 510–523.
66. Review: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components / P. Vos, M. M. Faas, M. Spasojevic, J. Sikkema // *International Dairy Journal*. – 2010. – Vol. 20. – P. 292–302.
67. Desai, K. G. H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients / K. G. H. Desai, H. J. Park // *Drying Technology*. – 2005. – Vol. 23. – P. 1361–1394.
68. McClements, D. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems / D. McClements, U. Lesmes // *Trends in Food Science & Technology*. – 2009. – Vol. 20. – P. 448–457.

69. Xie, A. Food gum based hydrogel polymers / A. Xie, C. Zhu, L. Hua // *MOJ Food Processing & Technology*. – 2017. – Vol. 4. – P. 192–196.
70. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in hyaluronic acid-based hydrogel for pathogen-targeted delivery to ameliorate enteritis / Y. Xiao, C. Lu, Y. Liu [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2020. – Vol. 12, No. 33. – P. 36967–36977.
71. Jo, Y.-J. Collagen peptide loaded W₁/O single emulsions and W₁/O/W₂ double emulsions: influence of collagen peptide and salt concentration, dispersed phase fraction and type of hydrophilic emulsifier on droplet stability and encapsulation efficiency / Y.-J. Jo, H. P. Karbstein, U. S. van der Schaaf // *Food & Function*. – 2019. – Vol. 10, No. 6. – P. 3312–3323.
72. Burdock, G.A. Generally recognized as safe (GRAS): history and description / G.A. Burdock, I.G. Carabin // *Toxicology Letters*. – 2004. – Vol. 150, No. 1. – P. 3-18.
73. Effects of novel and conventional thermal treatments on the physicochemical properties of iron-loaded double emulsions / S. M. H. Hosseini, H. H. Gahruie, M. Razmjooie [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 270. – P. 70–77.
74. Preparation of α linolenic acid loaded water in oil in water microemulsion and its potential as a fluorescent delivery carrier with a free label / Q. Li, L. Dang, S. Li [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 66, No. 49. – P. 13020–13030.
75. Chinese quince seed gum: flow behaviour, thixotropy and viscoelasticity / L. Wang, H. M. Liu, C. Y. Zhu [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 209. – P. 230–238.
76. Chinese quince (*Chaenomeles sinensis*) seed gum: structural characterization / L. Wang, H.-M. Liu, A.-J. Xie [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2018. – Vol. 75. – P. 237–245.
77. Gombotz, W. R. Protein release from alginate matrices / W. R. Gombotz, S. Wee // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1998. – Vol. 31, No. 3. – P. 267–285.

78. Electrosprayed mucoadhesive alginate chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics / L. P. Ta, E. Bujna, S. Kun [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 597. – P. 120342.

79. Assembly of propylene glycol alginate/ β lactoglobulin composite hydrogels induced by ethanol for co delivery of probiotics and curcumin / J. Su, Y. Cai, Z. Zhi [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 254. – P. 117446.

80. Alginate based double network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: effect of biopolymer type and concentrations / X. Qi, S. Simsek, B. Chen, J. Rao // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 165. – P. 1675–1685.

81. Praepanitchai, O.-A. Survival and behavior of encapsulated probiotics (*Lactobacillus plantarum*) in calcium alginate soy protein isolate based hydrogel beads in different processing conditions (pH and temperature) and in pasteurized mango juice / O.-A. Praepanitchai, A. Noomhorm, A. K. Anal // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019.

82. A pH responsive gel macrosphere based on sodium alginate and cellulose nanofiber for potential intestinal delivery of probiotics / H. Zhang, C. Yang, W. Zhou [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2018. – Vol. 6, No. 11. – P. 13924–13931.

83. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics / P. E. Ramos, P. Silva, M. M. Alario [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2018. – Vol. 77. – P. 8–16.

84. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin / T. Huq, C. Frascini, A. Khan [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – Vol. 168. – P. 61–69.

85. Fareez, I. M. Chitosan coated alginate xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12 / I. M. Fareez, S. M. Lim, R. K. Mishra, K. Ramasamy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – Vol. 72. – P. 1419–1428.

86. Preparation of pH sensitive carboxymethyl cellulose/chitosan/alginate hydrogel beads with reticulated shell structure to deliver *Bacillus subtilis natto* / M. Wang, Y. Zang, K. Hong [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 192. – P. 684–691.

87. Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives / N. Vassilev, M. Vassileva, V. Martos [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 270.

88. Chen, F.-P. Spray drying microencapsulation of curcumin nanocomplexes with soy protein isolate: encapsulation, water dispersion, bioaccessibility and bioactivities of curcumin / F.-P. Chen, L.-L. Liu, C.-H. Tang // *Food Hydrocolloids*. – 2020. – Vol. 105. – P. 105821.

89. Krunić, T. Z. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture / T. Z. Krunić, N. S. Obradović, M. B. Rakin // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 293. – P. 74–82.

90. Tarhini, M. Protein based nanoparticles: from preparation to encapsulation of active molecules / M. Tarhini, H. Greige Gerges, A. Elaissari // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 522, No. 1–2. – P. 172–197.

91. Ariyaratna, I. R. Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability / I. R. Ariyaratna, D. N. Karunaratne // *Food and Bioproducts Processing*. – 2015. – Vol. 95. – P. 76–82.

92. Development and characterisation of whey protein micro beads as potential matrices for probiotic protection / S. Doherty, V. Gee, R. Ross [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2011. – Vol. 25, No. 6. – P. 1604–1617.

93. Ye, C. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: approaches, applications and challenges / C. Ye, H. Chi // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – Vol. 83. – P. 233–246.

94. Protein encapsulation within synthetic molecular hosts / D. Fujita, K. Suzuki, S. Sato [et al.] // *Nature Communications*. – 2012. – Vol. 3, No. 1. – P. 1–7.

95. Potential for enriching next generation health promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components / C. Lordan, D. Thapa, R. P. Ross, P. D. Cotter // *Gut Microbes*. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – P. 1–20.

96. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics / G. R. Gibson, R. W. Hutkins, M. E. Sanders [et al.] // – 2017.

97. Slavin, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits / J. Slavin // *Nutrients*. – 2013. – Vol. 5, No. 4. – P. 1417–1435.

98. Neri Numa, I. A. Novel insights into prebiotic properties on human health: a review / I. A. Neri Numa, G. M. Pastore // *Food Research International*. – 2020. – Vol. 131. – P. 108973.

99. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry / M. C. R. Mano, I. A. Neri Numa, J. B. da Silva [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, No. 1. – P. 17–37.

100. Human colonic microbiota modulation and branched chain fatty acids production affected by soy protein hydrolysate / T. J. Ashaolu, B. Saibandith, C. T. Yupanqui, S. Wichienchot // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2019. – Vol. 54, No. 1. – P. 141–148.

101. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation / N. Yahfoufi, J. Mallet, E. Graham, C. Matar // *Current Opinion in Food Science*. – 2018. – Vol. 20. – P. 82–91.

102. Prebiotic protects against anatase titanium dioxide nanoparticles induced microbiota mediated colonic barrier defects / X. Li, Y. Zhang, B. Li [et al.] // *NanoImpact*. – 2019. – Vol. 14. – P. 100164.

103. A bridge for short chain fatty acids to affect inflammatory bowel disease, type 1 diabetes, and non alcoholic fatty liver disease positively: by changing gut barrier / W. Liu, X. Luo, J. Tang [et al.] // *European Journal of Nutrition*. – 2021. – Vol. 60, No. 5. – P. 2317–2330.

104. The prebiotic inulin improves substrate metabolism and promotes short chain fatty acid production in overweight to obese men / C. M. van der Beek, E. E. Canfora, A. M. Kip [et al.] // *Metabolism*. – 2018. – Vol. 87. – P. 25–35.

105. Dietary supplementation of β glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major* / M. A. Dawood, S. Koshio, M. Ishikawa [et al.] // *Aquaculture Nutrition*. – 2017. – Vol. 23, No. 1. – P. 148–159.

106. Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles / M. Yao, B. Li, H. Ye [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2018. – Vol. 83. – P. 246–252.

107. Co encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability / P. K. Okuro, M. Thomazini, J. C. Balieiro [et al.] // *Food Research International*. – 2013. – Vol. 53, No. 1. – P. 96–103.

108. Acrylamide from Maillard reaction products / R. H. Stadler, I. Blank, N. Varga [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 419, No. 6906. – P. 449–450.

109. Nooshkam, M. Maillard conjugate based delivery systems for the encapsulation, protection, and controlled release of nutraceuticals and food bioactive ingredients: a review / M. Nooshkam, M. Varidi // *Food Hydrocolloids*. – 2020. – Vol. 100. – P. 105389.

110. Whey protein isolate conjugated with xylo oligosaccharides via Maillard reaction: characterization, antioxidant capacity, and application for lycopene microencapsulation / C. Jia, D. Cao, S. Ji [et al.] // *LWT*. – 2020. – Vol. 118. – P. 108837.

111. Effect of microencapsulation with Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* / L. Liu, X. Li, Y. Zhu [et al.] // *LWT*. – 2016. – Vol. 73. – P. 37–43.

112. Development of soy protein isolate carrageenan conjugates through Maillard reaction for the microencapsulation of *Bifidobacterium longum* / L. Mao, Q. Pan, Z. Hou [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2018. – Vol. 84. – P. 489–497.

113. O'Brien, J. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods / J. O'Brien, P. Morrissey, J. Ames // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1989. – Vol. 28, No. 3. – P. 211–248.

114. Steinhart, H. *The Maillard Reaction. Chemistry, Biochemistry and Implications* / by Harry Nursten. – Wiley Online Library, 2005.

115. Food protein polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: a review / F. C. de Oliveira, J. S. d. R. Coimbra, E. B. de Oliveira [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2016. – Vol. 56, No. 7. – P. 1108–1125.

116. Antioxidant and antimicrobial activity of Maillard reaction products from xylan with chitosan/chitooligomer/glucosamine hydrochloride/taurine model systems / S. Wu, J. Hu, L. Wei [et al.] // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 148. – P. 196–203.

117. Encapsulation in the food industry: a review / B. F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli, C. N. Mulligan // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 1999. – Vol. 50. – P. 213–224.

118. Zuidam, N. J. Encapsulation of aroma / N. J. Zuidam, J. Heinrich // *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* / ed. by N. J. Zuidam, V. A. Nedovic. – Dordrecht: Springer, 2009. – P. 127–160.

119. Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax / J. Milanovic, V. Manojlovic, S. Levic [et al.] // *Sensors*. – 2010. – Vol. 10. – P. 901–912.

120. Porzio, M. A. Flavor delivery and product development / M. A. Porzio // *Food Technology*. – 2007. – Vol. 01, No. 07. – P. 22–29.

121. Comparison of different technologies for alginate beads production / U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bucko [et al.] // *Chemical Papers*. – 2008. – Vol. 62, No. 4. – P. 364–374.

122. Zuidam, N. J. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them / N. J. Zuidam, E. Shimoni // *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* / ed. by N. J. Zuidam, V. A. Nedovic. – Dordrecht : Springer, 2009. – P. 3–31.

123. Dewettinck, K. Fluidized bed coating in food technology / K. Dewettinck, A. Huyghebaert // Trends in Food Science & Technology. – 1999. – Vol. 10. – P. 163–168.

124. Kim, K. I. Effects of rehydration media and immobilization in Ca alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* / K. I. Kim, Y. H. Yoon, Y. J. Baek // Korean Journal of Dairy Science. – 1996. – Vol. 18. – P. 193–198.

125. ГОСТ 31450-2013. Молоко питьевое. Технические условия : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 7 июня 2013 г. № 43) : введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 268-ст. : введен впервые : дата введения 2014-07-01 / разработан ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии. – Москва: Стандартинформ, 2014. – 12 с. – Текст : непосредственный.

126. Вискозиметр «Брукфильд» DV-E. Инструкция по эксплуатации. – URL: www.aurora-lab.ru (дата обращения: 04.05.2021). – Текст : электронный.

127. ГОСТ 29224-91. Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения : межгосударственный стандарт : издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.91 № 2227 : дата введения 1993-01-01 / подготовлен и внесен Министерством общего машиностроения СССР. – Москва: Стандартинформ, 2005. – 12 с. – Текст : непосредственный.

128. Руководство по эксплуатации. рН-метр милливольтметр «рН-150». – 2016. – URL: www.lab-world.ru (дата обращения: 04.05.2021). – Текст : электронный.

129. ГОСТ 26809.1-2014. Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты :

межгосударственный стандарт : издание официальное: принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 46 от 5 декабря 2014 г.): введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2014 г. № 1977-ст с 1 января 2016 г.: дата введения 2016-01-01 / разработан ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 12 с. – Текст : непосредственный.

130. ГОСТ Р 54669-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности : межгосударственный стандарт : издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 826-ст: дата введения 2013-01-01 / разработан ГНУ «ВНИМИ» Россельхозакадемии. – Москва: Стандартинформ, 2012. – 14 с. – Текст : непосредственный.

131. ГОСТ 26754-85. Молоко. Методы измерения температуры : межгосударственный стандарт : издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 20.12.85 № 4381: введен впервые: дата введения 1986-01-12 / разработан Министерством сельского хозяйства СССР. – Москва: Стандартинформ, 2009. – 4 с. – Текст : непосредственный.

132. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов : межгосударственный стандарт : издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 25.12.91 № 2117 : переиздание : дата введения 1993-01-01 / разработан Всесоюзным научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП) ; Техническим комитетом 125 по стандартизации «Продукты переработки плодов и овощей». – Москва: Стандартинформ, 2008. – 8 с. – Текст : непосредственный.

133. ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011. Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической

оценки : межгосударственный стандарт : издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 июля 2011 г. № 170-ст: дата введения 2013-01-01 / подготовлен ОАО «ВНИИС» при участии ГНУ «ВНИИМС» Россельхозакадемии. – Москва: Стандартинформ, 2012. – 20 с. – Текст : непосредственный.

134. A Comparative Study on the Structural Properties and Lipid Profile of Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Powder Obtained by Different Drying Methods / S. Piskov, L. Timchenko, S. Avanesyan [et al.] // *Agriculture*. – 2022. – Vol. 12. – P. 1590. – URL: <https://doi.org/10.3390/agriculture12101590>.

135. Encapsulated Yeast in Mixed Fermentation of Secondary Dairy Raw Materials / I. Evdokimov, T. Nersesyan, I. Kulikova [et al.] // *Cheese- and buttermaking*. – 2024. – P. 42–47. – URL: <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2024-4-1>.

136. EDTA based adsorbents for the removal of metal ions in wastewater / K. Zhang, Z. Dai, W. Zhang [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – Vol. 434. – P. 213809. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213809>.

137. Improvement of Alginate Extraction from Brown Seaweed (*Laminaria digitata* L.) and Valorization of Its Remaining Ethanolic Fraction / I. M. Savić Gajić, I. M. Savić, A. M. Ivanovska [et al.] // *Marine Drugs*. – 2024. – Vol. 22. – P. 280. – URL: <https://doi.org/10.3390/md22060280>.

138. Thermogravimetric Analysis of Polymers / H. M. Ng, N. M. Saidi, F. S. Omar [et al.] // *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. – 2018. – P. 1–29. – URL: <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst667>.

139. Characterization and Establishment of Validated Reverse Phase HPLC Method for Bergapten Loaded Nanostructured Lipid Carriers / M. U. Rahman, S. Arshad, M. H. Asim [et al.] // *Chromatographia*. – 2025. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10337-025-04425-4>.

140. The efficacy of three double microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria / P. Pupa, P. Apiwatsiri, W. Sirichokchatchawan [et al.] //

Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – P. 13753. –
URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93263-z>.

141. Future trends in the field of Pickering emulsions: Stabilizers, spray dried microencapsulation and rehydration for food applications / W. Meng, H. Sun, T. Mu, M. Garcia Vaquero // Trends in Food Science & Technology. – 2024. – Vol. 150. – P. 104610. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104610>.

142. Petraitytė, S. Enhancing encapsulation efficiency of alginate capsules containing lactic acid bacteria by using different divalent cross linkers sources / S. Petraitytė, A. Šipailienė // LWT. – 2019. – Vol. 110. – P. 307–315. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.065>.

143. Ibraheem, U. Microencapsulation: methodologies and applications / U. Ibraheem, A. ur Rehman, N. Ahmed // Novel Formulations and Future Trends. – 2024. – P. 31–60. – URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91816-9.00020-5>.

144. Physico chemical properties of alginate/shellac aqueous core capsules: Influence of membrane architecture on riboflavin release / G. Ben Messaoud, L. Sánchez González, L. Probst [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 144. – P. 428–437. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.081>.

145. Current Challenges in Microcapsule Designs and Microencapsulation Processes: A Review / B. T. Lobel, D. Baiocco, M. Al Sharabi [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2024. – Vol. 16. – P. 40326–40355. – URL: <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02462>.

146. Технология инкапсулирования *Lactiplantibacillus plantarum* в оболочку альгината кальция для получения микрокапсул различных размеров / Р. Э. Григорян, В. П. Курченко, Н. А. Головнева, В. В. Денисенко [и др.] // Современная наука и инновации. – 2025. – № 1. – С. 135–149. – Текст : непосредственный.

147. Moghimi, E. Stress and flow inhomogeneity in shear thickening suspensions / E. Moghimi, J. S. Urbach, D. L. Blair // Journal of Colloid and Interface Science. – 2025. – Vol. 678. – P. 218–225. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.08.099>.

148. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency / N. V. N. Jyothi, P. M. Prasanna, S. N. Sakarkar [et al.] // *Journal of Microencapsulation*. – 2010. – Vol. 27. – P. 187–197. – URL: <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>.

149. Microcapsule production by droplet microfluidics: A review from the material science approach / M. Duran, A. Serrano, A. Nikulin [et al.] // *Materials & Design*. – 2022. – Vol. 223. – P. 111230. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111230>.

150. Advances in protein based microcapsules and their applications: A review / D. Ma, B. Yang, J. Zhao [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 263. – P. 129742. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129742>.

151. A review on chitosan and alginate based microcapsules: Mechanism and applications in drug delivery systems / S. U. D. Wani, M. Ali, S. Mehdi [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 248. – P. 125875. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125875>.

152. Spray and freeze drying of microcapsules prepared by complex coacervation method: A review / B. Muhoza, H. Yuyang, A. Uriho [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2023. – Vol. 140. – P. 108650. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108650>.

153. Regulation of mechanical properties of microcapsules and their applications / Z. Xiao, L. Zhou, P. Sun [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2024. – Vol. 375. – P. 90–104. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.09.001>.

154. Influence of Sodium Alginate Concentration on Microcapsules Properties Foreseeing the Protection and Controlled Release of Bioactive Substances / K. Essifi, M. Brahmi, D. Berraouan [et al.] // *Journal of Chemistry*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1–13. – URL: <https://doi.org/10.1155/2021/5531479>.

155. Choudhury, N. Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods / N. Choudhury, M. Meghwal, K. Das // *Food Frontiers*. – 2021. – Vol. 2. – P. 426–442. – URL: <https://doi.org/10.1002/fft2.94>.

156. Micro and Nanoencapsulation of Probiotics: Exploring Their Impact on Animal Origin Foods / K. Gutiérrez Álzate, L. A. Beltrán Cotta, B. S. dos Santos Rekowsky [et al.] // ACS Food Science & Technology. – 2024. – Vol. 4. – P. 2799–2812. – URL: <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00776>.

157. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review / F. J. Rodrigues, M. F. Cedran, J. L. Bicas, H. H. Sato // Food Research International. – 2020. – Vol. 137. – P. 109682. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>.

158. Kumar, P. Chitosan encapsulation of *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 improved its survival in simulated gastro intestinal conditions / P. Kumar, S. Dhanda // Process Biochemistry. – 2024. – Vol. 138. – P. 130–138. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.01.013>.

159. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications / S. Razavi, S. Janfaza, N. Tasnim [et al.] // Food Hydrocolloids. – 2021. – Vol. 120. – P. 106882. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>.

160. The application of multi particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt / B. Fayed, H. S. El Sayed, A. Abood [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – Vol. 22. – P. 101391. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101391>.

161. A comprehensive review of probiotic claims regulations: Updates from Asia Pacific, United States, and Europe / V. Garg, D. Velumani, Y.-C. Lin, A. Haye // PharmaNutrition. – 2024. – Vol. 30. – P. 100423. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2024.100423>.

162. Effects of different cryoprotectants on the viability of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* CJLP133 during long term storage / D. J. Shin, E. Elbegbayar, Y. Baek [et al.] // Journal of Food Measurement and Characterization. – 2023. – Vol. 17. – P. 3264–3271. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01863-2>.

163. A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends / K. Vivek, S. Mishra, R. C. Pradhan [et al.] // Applied Food

Research. – 2023. – Vol. 3. – P. 100248. –

URL: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>.

164. Latnikova, A. Towards Microcapsules with Improved Barrier Properties / A. Latnikova, M. Jobmann // *Topics in Current Chemistry*. – 2017. – Vol. 375. – P. 64. – URL: <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0152-5>.

165. Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: A review / P. Yun, S. Devahastin, N. Chiewchan // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2021. – Vol. 20. – P. 1768–1799. – URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12701>.

166. Thomas, K. J., III. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall / K. J. Thomas III, C. V. Rice // *BioMetals*. – 2014. – Vol. 27. – P. 1361–1370. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9797-5>.

167. Li, D. Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review / D. Li, Z. Zhu, D.-W. Sun // *Trends in Food Science & Technology*. – 2018. – Vol. 75. – P. 46–55. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.019>.

168. Control of ice crystal nucleation and growth during the food freezing process / G. Jia, Y. Chen, A. Sun, V. Orlien // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2022. – Vol. 21. – P. 2433–2454. – URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12950>.

169. Hosseini, M. Significant size change during bacterial cellulose capsule drying / M. Hosseini, P. T. Spicer // *Powder Technology*. – 2024. – Vol. 448. – P. 120275. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2024.120275>.

170. Microencapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* BXM2 in Bamboo Shoot Derived Nanocellulose Hydrogel to Enhance Its Survivability / Y. Huang, Q. Guan, Y. Wu [et al.] // *Gels*. – 2025. – Vol. 11. – P. 465.

171. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review / R. I. Corona Hernandez, E. Álvarez Parrilla, J. Lizardi Mendoza [et al.] // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2013. – Vol. 12. – P. 614–628. – URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12030>.

172. Encapsulation techniques, action mechanisms, and evaluation models of probiotics: Recent advances and future prospects / S. Yang, S. Wei, Y. Wu [et al.] // *Food Frontiers*. – 2024. – Vol. 5. – P. 1212–1239. – URL: <https://doi.org/10.1002/fft2.374>.

173. Влияние размеров микрокапсул с *Lactiplantibacillus plantarum* на их жизнеспособность / Р. Э. Григорян, В. П. Курченко, Н. А. Головнева, А. Д. Лодыгин [и др.] // *Современные достижения биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Инновационные биотехнологии природных и синтетических биологически активных веществ. Нарочанские чтения-16 : материалы IX Международной научно-практической конференции*. – Ставрополь : Северо-Кавказский федеральный университет, 2024. – С. 105–109. – Текст : непосредственный.

174. Capsule Formation Mechanisms in Interfacially Initiated Macroporous Hydrogels to Tailor Microstructures for the Encapsulation of Living Bacteria / A. P. Woodward Rowe, J.-Y. Mugnier, G. Depietra [et al.] // *ACS Applied Polymer Materials*. – 2024. – Vol. 6. – P. 11664–11677. – URL: <https://doi.org/10.1021/acsapm.4c02458>.

175. Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* by Emulsion Technique and Evaluation of Microparticle Properties and Bacterial Viability Under Storage, Processing, and Digestive System Conditions / F. Teymoori, S. Roshanak, S. Bolourian [et al.] // *Food Science & Nutrition*. – 2024. – Vol. 12. – P. 10393–10404. – URL: <https://doi.org/10.1002/fsn3.4533>.

176. Donati, I. Alginate metal cation interactions: Macromolecular approach / I. Donati, B. E. Christensen // *Carbohydrate Polymers*. – 2023. – Vol. 321. – P. 121280. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121280>.

177. Физико-химические свойства микрокапсул с *Lactiplantibacillus plantarum* различных размеров / Р. Э. Григорян, В. П. Курченко, И. В. Ржепаковский [и др.] // *Научно-практическое развитие АПК и производства продуктов здорового питания : материалы Международной научно-практической*

конференции. – Омск : ФГБОУ ВО Омский ГАУ, 2025. – С. 218–222. – Текст : непосредственный.

178. Controllable preparation of monodisperse alginate microcapsules with oil cores / C.-L. Mou, Q.-Z. Deng, J.-X. Hu [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2020. – Vol. 569. – P. 307–319. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.02.095>.

179. Encapsulation of resveratrol in alginate microcapsules using internal gelation technique: Fabrication, characterization and release kinetics / K. S. More, S. Kadavakollu, S. Nigar [et al.] // *LWT*. – 2024. – Vol. 207. – P. 116663. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116663>.

180. Protective Effect of Alginate Microcapsules with Different Rheological Behavior on *Lactiplantibacillus plantarum* 299v / M. A. Hernández Gallegos, F. Solorza Feria, M. Cornejo Mazón [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – P. 682. – URL: <https://doi.org/10.3390/gels9090682>.

181. Development of Alginate Composite Microparticles for Encapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* / M. Vinceković, L. Živković, E. Turkeyeva [et al.] // *Gels*. – 2024. – Vol. 10. – P. 752. – URL: <https://doi.org/10.3390/gels10110752>.

182. Сравнительное исследование физико-химических свойств микрокапсул с *Lactiplantibacillus plantarum* в зависимости от их размеров / Р. Э. Григорян, В. П. Курченко, Н. А. Головнева [и др.] // *Биотехнология: научные исследования и связь с производством: материалы Международной научно-практической конференции*. – Лосино-Петровский: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 2024. – С. 212–216. – Текст: непосредственный.

183. Encapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* Using Lactoferrin and Alginate: Layer by Layer Coating and Dual Coating Air Brush Approaches for Enhanced Stability / N. I. Diaz Negrete, G. Ramos Clamont Montfort, C. Cueto Wong [et al.] // *Dairy*. – 2025. – Vol. 6. – P. 27. – URL: <https://doi.org/10.3390/dairy6030027>.

184. Effects of secondary cross linking on the physicochemical properties of sodium alginate hydrogel and in vitro release of anthocyanins / Y.-X. Zhang, Y.-S.

Wang, Y. Chen [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 276. – P. 133926. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133926>.

185. Development of microcapsule based self healing composite: A critical review on influencing factors of microencapsulation, healing efficiency, thermal stability and application / Md. M. Adil, M. S. Rabbi, T. Tasnim // *Alexandria Engineering Journal*. – 2025. – Vol. 122. – P. 1–17. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2025.02.092>.

186. Thermal degradation and combustion properties of most popular synthetic biodegradable polymers / H. Chen, F. Chen, H. Chen [et al.] // *Waste Management & Research*. – 2022. – Vol. 41. – P. 431–441. – URL: <https://doi.org/10.1177/0734242x221129054>.

187. Bigger, S. W. Two novel algorithms for the thermogravimetric assessment of polymer degradation under non isothermal conditions / S. W. Bigger, M. J. Cran, I. S. M. A. Tawakkal // *Polymer Testing*. – 2015. – Vol. 43. – P. 139–146. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2015.03.002>.

188. Consistent DSC and TGA Methodology as Basis for the Measurement and Comparison of Thermo Physical Properties of Phase Change Materials / L. Müller, G. Rubio Pérez, A. Bach [et al.] // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – P. 4486. – URL: <https://doi.org/10.3390/ma13204486>.

189. Analysis of differential scanning calorimetry (DSC): determining the transition temperatures, and enthalpy and heat capacity changes in multicomponent systems by analytical model fitting / E. Ghanbari, S. J. Picken, J. H. van Esch // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2023. – Vol. 148. – P. 12393–12409. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10973-023-12356-1>.

190. Sargassum inspired, optimized calcium alginate bioplastic composites for food packaging / A. Mohammed, A. Gaduan, P. Chaitram [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2023. – Vol. 135. – P. 108192. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108192>.

191. Thermal degradation of calcium and sodium alginate: A greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles / P. dos Santos Araújo, G. B. Belini, G. P.

Mambrini [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 140. – P. 749–760. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.103>.

192. Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state in vivo / A. Mateus, J. Bobonis, N. Kurzawa [et al.] // Molecular Systems Biology. – 2018. – Vol. 14. – URL: <https://doi.org/10.15252/msb.20188242>.

193. Improving bacteria identification from digital melt assay via oligonucleotide based temperature calibration / A. Traylor, P.-W. Lee, K. Hsieh, T.-H. Wang // Analytica Chimica Acta. – 2024. – Vol. 1297. – P. 342371. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342371>.

194. Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations / Y. Yang, O. H. Campanella, B. R. Hamaker [et al.] // Food Hydrocolloids. – 2013. – Vol. 30. – P. 26–32. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.006>.

195. Sodium alginate and carbopol microcapsules: preparation, polyphenol encapsulation and release efficiency / E. V. Popova, P. V. Morozova, M. V. Uspenskaya, A. S. Radilov // Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Vol. 70. – P. 1335–1340. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3220-5>.

196. Deconstruction and Reassembly of Renewable Polymers and Biocolloids into Next Generation Structured Materials / B. L. Tardy, B. D. Mattos, C. G. Otoni [et al.] // Chemical Reviews. – 2021. – Vol. 121. – P. 14088–14188. – URL: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01333>.

197. Calcium assisted hydrothermal carbonization of an alginate for the production of carbon microspheres with unique surface nanopores / J. Chen, Z. Chen, C. Wang, X. Li // Materials Letters. – 2012. – Vol. 67. – P. 365–368. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.10.017>.

198. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium / J. A. Imlay // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 443–454. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.

199. Hosseini Nezhad, M. Stress Responses in Probiotic *Lactobacillus casei* / M. Hosseini Nezhad, M. A. Hussain, M. L. Britz // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2014. – Vol. 55. – P. 740–749. – URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.675601>.

200. Recent advances in food applications of phenolic loaded micro/nanodelivery systems / S. A. Siddiqui, N. A. Bahmid, A. Taha [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2022. – Vol. 63. – P. 8939–8959. – URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2056870>.

201. Bioactive compounds in fermented foods: Health benefits, safety, and future perspectives / S. Fitsum, G. Gebreyohannes, D. B. Sbhatu // *Applied Food Research*. – 2025. – Vol. 5. – P. 101097. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101097>.

202. Microencapsulation Techniques for Probiotic Formulations: Current Scenario and Future Perspective / T. Jan, R. Negi, A. Hilal [et al.] // *Journal of Food Quality*. – 2025. – Vol. 2025. – URL: <https://doi.org/10.1155/jfq/6738124>.

203. Improving the survival of *Lactobacillus plantarum* NRRL B 1927 during microencapsulation with ultra high pressure homogenized soymilk as a wall material / G. Cavender, N. Jiang, R. K. Singh [et al.] // *Food Research International*. – 2021. – Vol. 139. – P. 109831. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109831>.

204. Mechanistic study of the differences in lactic acid bacteria resistance to freeze or spray drying and storage / M. Gagneten, S. Passot, S. Cenard [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2024. – Vol. 108. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13186-3>.

205. Zaręba, D. Tween 80™ induced changes in fatty acid profile of selected mesophilic lactobacilli / D. Zaręba, M. Ziarno // *Acta Biochimica Polonica*. – 2024. – Vol. 71. – URL: <https://doi.org/10.3389/abp.2024.13014>.

206. ГОСТ 32923-2014 «Продукты кисломолочные, обогащенные пробиотическими микроорганизмами. Технические условия» // Интернет-библиотека нормативных документов : [сайт]. – URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/58853/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст : электронный.

207. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности молока и молочной продукции (ТР ТС 033/2013) : [принят Решением Совета Евразийской Экономической Комиссии 9 октября 2013 года № 67 (с изменениями на 15 июля 2022 года)]. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/499050562> (дата обращения: 02.03.2026). – Текст : электронный.

208. Технология молока и молочных продуктов / Г. Н. Крусъ, А. Г. Храпцов, З. В. Волокотина, С. В. Карпычев; под редакцией А. М. Шалыгиной. – Москва: КолосС, 2007. – 455 с. – Текст : непосредственный.

209. Белозерова, Л. Л. Обеспечение качества и безопасности пищевой продукции / Л. Л. Белозерова, И. И. Фролова // Технологии производства пищевых продуктов питания и экспертиза товаров. – 2015. – С. 26–30. – Текст : непосредственный.

210. Дмитриев, А. Д. Вопросы современного менеджмента и внедрения системы ХАССП в индустрии питания / А. Д. Дмитриев, М. Г. Андреева, В. Ф. Иванов // Экономика: вчера, сегодня, завтра. – 2018. – Т. 8, № 11А. – С. 25–32. – Текст : непосредственный.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Уведомление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности

Федеральное государственное бюджетное
учреждение



«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18

Форма N 91 ИЗ-2025
910

ФГАОУ ВО "СКФУ", Алиханову Анатолию
Алиевичу
ул. Пушкина, 1
г. Ставрополь
355017

На № - от -
Нап № 2025116066/04(037866)
При перепишке просим ссылаться на номер заявки
Исходящая корреспонденция от **27.06.2025**

У В Е Д О М Л Е Н И Е

о положительном результате формальной экспертизы
заявки на изобретение

(21) Заявка № 2025116066/04(037866)

Дата поступления документов заявки 10.06.2025

(22) Дата подачи заявки 10.06.2025

(71) Заявитель(и) Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования "Северо-Кавказский федеральный университет", RU

(54) Название изобретения Способ микрокапсуляции микроорганизмов и устройство для его
осуществления

2		200239
---	--	--------

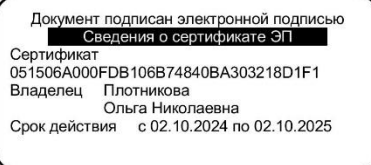


По результатам формальной экспертизы заявитель уведомляется о том, что формальная экспертиза заявки на изобретение, проведенная в соответствии со ст. 1384 Кодекса*, завершена с положительным результатом.

Дополнительно заявитель уведомляется о том, что:

- ходатайство о проведении экспертизы заявки по существу поступило 10.06.2025. Результаты рассмотрения ходатайства будут сообщены дополнительно.
- ходатайство о выдаче патента на бумажном носителе поступило 10.06.2025
- ходатайство о предоставлении права на уплату пошлины в уменьшенном размере удовлетворено.

Главный специалист
отдела формальной
экспертизы заявок на
изобретения ФИПС



О. Н. Плотникова
8(499)240-34-92

*Информация о состоянии делопроизводства по заявке может быть получена по телефону 8 (499) 240 60 15;
 *Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы/Открытые реестры»;
 *При изменении адреса для переписки необходимо сообщить об этом незамедлительно.

*Гражданский кодекс Российской Федерации Часть четвертая от 18 декабря 2006 г. N 231-ФЗ с изменениями и дополнениями.

**Положение о патентных и иных пошлинах за совершение юридически значимых действий, связанных с патентом на изобретение, полезную модель, промышленный образец, с государственной регистрацией товарного знака и знака обслуживания, с государственной регистрацией и предоставлением исключительного права на географическое указание, наименование места происхождения товара, а также с государственной регистрацией отчуждения исключительного права на результат интеллектуальной деятельности или средство индивидуализации, залога исключительного права, предоставления права использования такого результата или такого средства по договору, перехода исключительного права на такой результат или такое средство без договора, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 10.12.2008 N 941 с изменениями.

***Административный регламент предоставления Федеральной службой по интеллектуальной собственности государственной услуги по государственной регистрации изобретения и выдаче патента на изобретение, его дубликата утвержден приказом Федеральной службы по интеллектуальной собственности от 11.12.2020 N 163, зарегистрированным Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62501.

****Правила составления, подачи и рассмотрения документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретений, и их формы, утверждены приказом Минэкономразвития России от 21.02.2023 N 107, зарегистрированным Минюстом России 17.04.2023, регистрационный N 73064, с изменениями.

*****Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение утверждены приказом Минэкономразвития России от 21.02.2023 N 107, утверждены приказом Минэкономразвития России от 21.02.2023 N 107, зарегистрированным Минюстом России 17.04.2023, регистрационный N 73064, с изменениями.

Приложение Б

Уведомление о приеме и регистрации заявки на изобретение

Форма № 94 ИЗ,ПМ,ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП - 3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

03.03.2026 <i>Дата поступления (дата регистрации)</i>	W26012150 <i>Входящий №</i>	2026105601 <i>Регистрационный №</i>
---	---------------------------------------	---

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ <small>(дата регистрации) оригиналов документов заявки</small>	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) <small>Регистрационный номер международной заявки в сфере международной почты, установленные международные обязательства)</small> <input type="checkbox"/> (87) <small>(номер и дата международной публикации международной заявки)</small> <input type="checkbox"/> (96) <small>(номер европейской заявки и дата ее подачи)</small> <input type="checkbox"/> (97) <small>(номер и дата публикации европейской заявки)</small>	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <small>(почтовый адрес, фамилия и инициалы или наименование адресата)</small> 355017, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д.1, проректору по научной работе Зенченко Светлане Вячеславовне, Зенченко Светлане Вячеславовне (355017, g. Stavropol, ul. Pushkina, d.1, prorektoru po nauchnoy rabote Zenchenko Svetlane Vyacheslavovne, Zenchenko Svetlana Vyacheslavovna) Телефон: 88652330556 Факс: Адрес электронной почты: psfa.patent@yandex.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <small>(указывается при подаче заявки на секретное изобретение)</small>	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента на изобретение	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ УСТРОЙСТВО ДЛЯ МИКРОКАПСУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс) Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Северо-Кавказский федеральный университет" (Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniia "Severo-Kavkazskii federalnyi universitet") 355017, Российская Федерация, Ставропольский кр., г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1 (Rossiyskaya Federatsiya, Stavropolskiy kr., g. Stavropol, ul. Pushkina, 1)	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1 02 26 01 96158 0 КПП 26 34 01 001 ИНН 26 35 01495 5 СНИЛС ДОКУМЕНТ (авт. серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU	
<input type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту <input type="checkbox"/> соглашению о предоставлении субсидии <input type="checkbox"/> гранту <input type="checkbox"/> государственному заданию <input type="checkbox"/> инновационному заданию заказчик работ (указать наименование)		

Общее количество документов в листах	32	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)		Автоматизированная система
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/register-web		

Приложение В

Акт использования материалов диссертации в учебном процессе

Утверждаю

И.о. заместителя декана по
учебной работе факультета
пищевой инженерии и
биотехнологий имени
академика А.Г. Храмцова

Стапенко Е.Н.
«23» 01 2026 г.

АКТ

об использовании в учебном процессе материалов диссертации на соискание
ученой степени кандидата технических наук по специальностям
4.3.3. Пищевые системы, 4.3.5 Биотехнология продуктов питания и
биологически активных веществ
Григорян Розы Эмировны

Комиссия в составе: Лодыгин Алексей Дмитриевич, заведующий кафедрой прикладной биотехнологии, доктор технических наук, доцент; Абакумова Елена Анатольевна, доцент кафедры прикладной биотехнологии, кандидат технических наук; Куликова Ирина Кирилловна, доцент кафедры прикладной биотехнологии, кандидат технических наук, доцент установила, что результаты диссертационной работы Григорян Р.Э., представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальностям 4.3.3. Пищевые системы, 4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ используются в учебном процессе факультета пищевой инженерии и биотехнологий имени академика А.Г. Храмцова по дисциплинам:

- «Основы промышленной биотехнологии» при проведении занятий у студентов бакалавриата по направлению подготовки 19.03.01 – Биотехнология;

- «Технология молока и молочных продуктов» при проведении занятий у студентов бакалавриата по направлению подготовки 19.03.03 – Продукты питания животного происхождения;

- «Биотехнология микроорганизмов» для студентов магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 – Биотехнология.

Комиссия рекомендует к дальнейшему использованию в учебном процессе результаты диссертационных исследований Григорян Р.Э.

Председатель комиссии
Члены комиссии

А.Д. Лодыгин
Е.А. Абакумова
И.К. Куликова

Приложение Г

Акт выработки экспериментальных партий микрокапсул различного размера из альгината натрия с *Lactiplantibacillus plantarum*



Первый проректор ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

А.А.Лиховид

2025 г.

Акт

выработки экспериментальных партий микрокапсул различного размера из альгината натрия с *Lactiplantibacillus plantarum*

г. Ставрополь

_____.2025 г.

Настоящий акт составлен комиссией в составе заведующего кафедрой прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» Лодыгина А.Д., старшего научного сотрудника НИЛ пищевой и промышленной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий имени академика А.Г. Храмова ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» Шрамко М.И., инженера НИЛ пищевой и промышленной биотехнологии Григорян Р.Э., заведующего НИЛ прикладных проблем биологии кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета Белорусского государственного университета Курченко В.П., ведущего научного сотрудника НИЛ прикладных проблем биологии Головач Т.Н., в том, что на базе НИЛ пищевой и промышленной биотехнологии проведена выработка экспериментальных партий микрокапсул различного размера из альгината натрия с *Lactiplantibacillus plantarum* БИМ-В 492 (*L. plantarum* БИМ-В 492).

Капсулирование *L. plantarum* БИМ-В 492 проводили на экспериментальной установке ИИ 0.35–1.5 (ООО «МЗТА», Россия). Она предназначена для микрогранулирования лактобактерий и других объектов методом экструзии. Для получения микрокапсул различного размера готовили дисперсную систему, состоящую из дисперсной фазы – *L. plantarum* БИМ-В 492 и дисперсной среды – 2 %-го раствора альгината натрия (ANa) в соотношении 1 : 9. Полученную смесь объемом 2 л помещали в емкость для дисперсной системы.

Процесс микрогранулирования *L. plantarum* БИМ-В 492 состоял из 4 стадий. Микрокапсулы получали в асептических условиях. На первой стадии дисперсную систему из ANa и лактобактерий подавали под заданным давлением из емкости на диспергатор. На второй стадии смесь поступала на форсунки вращающегося диспергатора. В результате центробежного разбрызгивания дисперсной системы формировались капли гелеподобной фазы. Устанавливая скорость вращения диспергатора (900, 1200, 1600, 2000 об/мин), формировали гелевые капли, которые попадали на внутренние стенки конического гранулятора. С увеличением скорости вращения диспергатора их размер уменьшался.


Третья стадия формирования микрокапсул состояла в обработке полученных капель дисперсной системы 5%-м раствором хлористого кальция для образования водонерастворимого альгината кальция (АСа). Раствор хлористого кальция подавали под заданным давлением на форсунки, расположенные по периметру верхней части гранулятора. Поток коагулянта они смывались в отверстие узкой части конуса гранулятора и попадали на вращающийся круглый стол для промывки. На четвертом этапе осуществляли промывку микрокапсул дистиллированной водой. Вода для промывки поступала под заданным давлением на форсунки и удалялась через сетку вращающегося стола. Готовые микрокапсулы собирались в приемник и переносились в емкость из лавсановой ткани для удаления воды. Полученные гидратированные капсулы замораживали при температуре минус 39,0–40,0 °С в течение 72 ч. Последующую сушку проводили в течение 27–30 ч в камере сублимационной сушилки ВК-FD10PT (Biobase, Китай) при среднем рабочем давлении в сушильной камере 80,0–90,0 Па, температуре в конденсаторе 48,0–49,0 °С. Образцы микрокапсул хранили при температуре от 2 до 8 °С. Проводили комплексный анализ гидратированных и сублимированных микрокапсул. Исследовали морфологию, размеры, количество капсул и содержание в них жизнеспособных клеток (по ГОСТ 10444.11-2013).

Согласно результатам испытаний размер гидратированных микрокапсул составил 805, 725, 547 и 304 мкм, тогда как сублимационная сушка обусловила его уменьшение до 400, 375, 250 и 200 мкм соответственно. Установлено, что с уменьшением размера сублимированных микрокапсул наблюдается снижение содержания в них жизнеспособных лактобактерий *L. plantarum* БИМ-В 492 с 24×10^7 КОЕ до $0,8 \times 10^7$ КОЕ в расчете на 1 г капсул. Применение микрокапсул из альгината натрия с *L. plantarum* БИМ-В 492 позволит обогатить рацион питания пробиотическими лактобактериями.

Комиссия сделала заключение:

Полученные сублимированные капсулированные формы с *L. plantarum* БИМ-В 492 могут быть использованы в качестве пробиотического средства при производстве пищевых продуктов функционального назначения.

 А.Д. Лодыгин
М.И. Шрамко

 Р.Э. Григорян

 В.П. Курченко

 Т.Н. Головач

Приложение Д

Технические условия на закваски в микроинкапсулированной форме

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

ОКПД 2 10.89.19.330

ОКС 67.100. (Группа Н17)



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе

С.В. Зенченко
2025г.

ЗАКВАСКИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА В МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЕ

Технические условия
ТУ 10.89.19.330-024-02067965-2024
(вводятся впервые)

Дата введения в действие 12. 04.20 26г.

РАЗРАБОТАНО:

Заведующий базовой кафедрой технологии молока
и молочных продуктов ФПИИБ им. академика

А.Г. Храмова

И.А. Евдокимов Евдокимов И.А.

личная подпись

Главный научный сотрудник НИЛ пищевой и
промышленной биотехнологии ФПИИБ им.
академика А.Г. Храмова

А.Д. Лодыгин Лодыгин А.Д.

личная подпись

Старший научный сотрудник НИЛ пищевой и
промышленной биотехнологии ФПИИБ им.
академика А.Г. Храмова

М.И. Шрамко Шрамко М.И.

личная подпись

Инженер НИЛ пищевой и промышленной
биотехнологии ФПИИБ им. академика А.Г.
Храмова

Р.Э. Григорян Григорян Р.Э.

личная подпись

Инженер НИЛ пищевой и промышленной
биотехнологии ФПИИБ им. академика А.Г.
Храмова

Е.В. Цыкин Цыкин Е.В.

личная подпись

Приложение Е

Технические условия на продукты кисломолочные

Общество с ограниченной ответственностью "ДМГ"

ОКНД 2 10.86.10.142

ОКС 67.100.01 (Груша 1117)

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор


Д. Н. Володин
с 29» 12 2025 г.





ПРОДУКТЫ КИСЛОМОЛОЧНЫЕ, ОБОГАЩЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ В МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЕ


Технические условия
ТУ 10.51.56.444-002-21986117-2025
(вводятся впервые)


Дата введения в действие 29. 12. 2025 г.

РАЗРАБОТАНО:

«Северо-Кавказский федеральный
университет»
Заведующий базовой кафедрой технологии молока
и молочных продуктов, член-корр. РАН

личная подпись Евдокимов И.А.

Главный научный сотрудник НИИ пищевой и
промышленной биотехнологии, профессор

личная подпись Лодыгин А.Д.

Старший научный сотрудник НИИ пищевой и
промышленной биотехнологии, доцент

личная подпись Прамо М.И.

Инженер НИИ пищевой и промышленной
биотехнологии

личная подпись Григорян Р.Э.

«ООО ДМГ»
Технолог-аналитик

личная подпись Куликова И.К.

г. Ставрополь
2025

Приложение Ж

Акт опытно-промышленной выработки кисломолочного продукта

УТВЕРЖДАЮ:
 Генеральный директор
 АО «Молочный комбинат
 «Ставропольский»
 Анисимов С.В.
 «09» октября 2025 г.



АКТ

опытно-промышленной выработки продукта кисломолочного,
 обогащенного пробиотическими микроорганизмами в
 микроинкапсулированной форме

Комиссия в составе ведущего инженер-технолога научно-исследовательской лаборатории молочных и функциональных ингредиентов АО «Молочный комбинат «Ставропольский», к.т.н., Золоторевой М.С., главного научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории пищевой и промышленной биотехнологии «Северо-Кавказского федерального университета» (НИЛ СКФУ), д.т.н., Лодыгина А.Д., старшего научного сотрудника НИЛ СКФУ, к.б.н., Шрамко М.И., инженера НИЛ СКФУ, Григорян Р.Э., составили настоящий акт о том, что в период с 7 по 9 октября 2025 г. на базе АО «Молочный комбинат «Ставропольский» были проведены опытно-промышленные выработки продукта кисломолочного, обогащенного пробиотическими микроорганизмами в микроинкапсулированной форме, по технологическому регламенту, представленному НИЛ СКФУ.

Последовательность технологических операций определена на основе проекта ТУ и ТИ на производство продукта кисломолочного, обогащенного пробиотическими микроорганизмами *Lactiplantibacillus plantarum* в микроинкапсулированной форме. Гидратированные микрокапсулы микроорганизмов были получены на экспериментальной установке ИИ 0.35-1.5 в НИЛ СКФУ, а затем высушены в сублимационной сушилке на базе МНОЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» СКФУ. Количество жизнеспособных клеток *L. plantarum* в микрокапсулах зависело от их размера и составило от $2,4 \cdot 10^8$ КОЕ до $0,8 \cdot 10^7$ КОЕ/ г. Средний размер сублимированных микрокапсул был в пределах (200-400) мкм.

Для производства продукта кисломолочного, обогащенного пробиотическими микроорганизмами, использовали молоко цельное коровье нормализованное с массовой долей жира 2,5% в количестве 550 кг, производственную закваску *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (15 кг), лиофильно высушенную культуру *Lactiplantibacillus plantarum* в микроинкапсулированной форме (15 кг). Молоко нормализованное по

массовой доле жира предварительно пастеризовали при температуре 90-92°C с выдержкой 2-3 минуты, гомогенизировали при давлении 12,5-15 МПа и охлаждали до температуры 38-40°C. В нормализованное молоко вносили производственную закваску *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, лиофильно высушенную культуру *Lactiplantibacillus plantarum* в микроинкапсулированной форме. Скваживание проводили в течение 3,5-4 часов при температуре 38-40°C. Продукт кисломолочный вырабатывали резервуарным способом. Титруемая кислотность продукта по завершении процесса сквашивания (образования кисломолочного сгустка) составила 80-85°Т.

Анализ готовой продукции показал соответствие органолептических, физико-химических и микробиологических показателей заявленным в проекте технологической инструкции характеристикам, а также соответствие микробиологических характеристик требованиям ТР ТС 033/2013 (ред. 23 июня 2023 года) для кисломолочных продуктов.

Комиссия отмечает, что в пищевой промышленности принято считать минимально рекомендуемый уровень пробиотиков в обогащенных продуктах на момент употребления должен составлять не менее 10^6 КОЕ/мл. Поэтому, все микрокапсулы полученных размеров могут быть использованы в качестве пробиотического средства при производстве продукта кисломолочного, обогащенного пробиотическими микроорганизмами *Lactiplantibacillus plantarum* в микроинкапсулированной форме.

По мнению членов комиссии, технология производства продукта кисломолочного, обогащенного пробиотическими микроорганизмами *Lactiplantibacillus plantarum* в микроинкапсулированной форме, может быть широко реализована на предприятиях молочной промышленности.

От АО «МК «Ставропольский»



Золоторева М.С.

От Северо-Кавказского
федерального университета





Лодыгин А.Д.

Шрамко М.И.

Григорян Р.Э.

Приложение 3

Сертификат о прохождении научной стажировки в рамках программы академической мобильности



Приложение И

Итоговая карта контроля ХАССП для производства кисломолочного биопродукта с микроинкапсулированной культурой *Lpb. plantarum*

Номер ККТ	Технологическая операция	Опасный фактор	Критические пределы	Процедура мониторинга	Периодичность мониторинга	Ответственный	Предупреждающие действия	Корректирующие действия при нарушении пределов	Регистрационная запись
ККТ-1	Пастеризация	Биологический: выживание патогенных микроорганизмов (сальмонеллы, листерии, БГКП)	Температура: 90–92 °С; Время выдержки: 2–3 мин.	Непрерывная регистрация температуры и времени выдержки; визуальный контроль показаний термографов; проверка датчиков	Непрерывно / 1 раз в месяц	Оператор ТО, технолог	Своевременное техническое обслуживание; калибровка датчиков; наличие запасных термопар	Остановка процесса; возврат продукта на повторную пастеризацию; ремонт пастеризатора; внеплановая проверка	Журнал пастеризации, диаграммы, протоколы проверки
ККТ-2	Внесение микроинкапсулированных пробиотических культур (<i>Lpb. plantarum</i> A2) и <i>Str. thermophilus</i>	Биологический: низкая активность заквасок, контаминация посторонней микрофлорой; Физический: повреждение	Активность <i>Str. thermophilus</i> : $\geq 2 \times 10^9$ КОЕ/г; Активность <i>Lpb. plantarum</i> (капс.): $\geq 1 \times 10^9$ КОЕ/г; Отсутствие БГКП,	Входной контроль каждой партии заквасок (анализ сертификатов, лабораторные испытания); контроль	Каждая партия	Микробиолог, оператор	Соблюдение условий хранения заквасок ($t \leq -18$ °С для сухих форм / $t \leq 4$ °С для капсул); ротация запасов; щадящий	Возврат поставщику; корректировка дозы; дезинфекция дозатора; замена партии закваски	Журнал учёта заквасок, сертификаты анализа, протоколы испытаний

		капсульной оболочки, неравномерное дозирование	патогенов; Целостность капсул: не менее 95 %	массы/объёма при дозировании; микроскопирование (целостность капсул)			режим дозирования; предварительная калибровка дозатора		
ККТ-3	Ферментация (сбраживание)	Биологический: развитие посторонней микрофлоры, ингибирование заквасок; Физико-химический: нарушение структурообразования, недостижение целевой кислотности	Температура: 38 - 40 °С; Продолжительность: 3,5-4 ч; рН на момент остановки: 5,1 ± 0,1; Титруемая кислотность: 85-90 °Т (контрольный параметр)	Непрерывный контроль температуры; контроль рН и титруемой кислотности каждый час; визуальный контроль сгустка	Каждый час / непрерывно	Технолог, лаборант	Калибровка рН-метров и термометров; предварительная активизация заквасок; соблюдение рецептуры; контроль ингибирующих веществ в молоке	Корректировка температуры; продление/сокращение времени ферментации; внеплановый микробиологический контроль; изоляция продукта при отклонении рН > 0,2	Журнал ферментации, графики рН и температуры
ККТ 4	Фасовка и укупорка	Биологический: вторичная контаминация; Физический: нарушение герметичности, инородные тела	Микробиологическая чистота: отсутствие БГКП в 0,1 г продукта; Герметичность упаковки: 100 %; Целостность упаковки:	Микробиологический контроль смывов с оборудования и готового продукта; визуальный контроль целостности; автоматическ	1 раз/смену / каждая партия / непрерывно	Фасовщик, лаборант	Стерилизация упаковки; санитарная обработка фасовочного автомата перед началом работы; соблюдение	Остановка фасовочной линии; дезинфекция оборудования; изоляция и повторный контроль продукции, расфасованной с момента	Журнал фасовки, протоколы микробиологических испытаний, отчёты тестера герметичности

			отсутствие видимых дефектов	ий контроль герметичнос ти (тестер)			асептики; калибровка тестера герметично сти	последней проверки; переваловка при нарушении герметичност и	
--	--	--	-----------------------------------	---	--	--	---	--	--

Приложение К

Расчеты экономических показателей производства кисломолочного продукта с использованием микроинкапсулированных культур пробиотиков

Затраты сырья и основных материалов на 1 т продукта в соответствии с предложенной рецептурой (раздел 5.1) составят:

- при использовании разработанной технологии производства с капсулированной формой культуры пробиотика:

$$C_c = 950 \cdot 45 + 35 \cdot 200 + 15 \cdot 280 = 55\,700 \text{ руб.}$$

- при использовании традиционной технологии производства со свободной культурой:

$$C_k = 950 \cdot 45 + 35 \cdot 200 + 15 \cdot 650 = 61\,250 \text{ руб.}$$

Рассчитаем стоимость вспомогательных материалов, принимаем в размере 10% от стоимости сырья и основных материалов:

$$C_{c.всп} = 0,1 \cdot 55\,700 = 5570 \text{ руб.}$$

$$C_{k.всп} = 0,1 \cdot 61\,250 = 6125 \text{ руб.}$$

Расходы на заработную плату. Технологическую трудоемкость производства 1 т кисломолочного продукта определим по формуле:

$$T_p = (P_p \cdot Ч) / O, \tag{К.1}$$

где P_p – продолжительность смены, ч;

$Ч$ – численность рабочих, чел;

O – объем производства продукции в сутки (принят из материального расчета), т.

Технологическая трудоемкость 1 т производства напитков составит:

$$T_p = (8 \cdot 4) / 1 = 32 \text{ чел} \cdot \text{ч.}$$

Расценку на 1 т продукции рассчитываем по формуле:

$$З_{ц} = T_{\text{час}} \cdot T_p, \tag{К.2}$$

где $T_{\text{час}}$ – часовая тарифная ставка (принимаяем $T_{\text{час}} = 180 \text{ руб.}$).

Тогда

$$З_{ц} = 180 \cdot 32 = 5760,0 \text{ руб.}$$

Сдельный фонд заработной платы определяется по формуле:

$$З_{сд} = O_{г} \cdot З_{ц}, \quad (K.3)$$

где $O_{г}$ – годовой объем производства продукции (300 т).

$$З_{сд} = 300 \cdot 5760 = 1\,728\,000,0 \text{ руб.}$$

Величину доплат принимаем равной 20 % от сдельного фонда:

$$Д = 0,2 \cdot 1\,728\,000 = 345\,600,0 \text{ руб.}$$

Основной фонд заработной платы рассчитывается по формуле:

$$З_{осн} = З_{сд} + Д, \quad (K.4)$$

$$З_{осн} = 1\,728\,000 + 345\,600 = 2\,073\,600,0 \text{ руб.}$$

Дополнительную заработную плату принимаем равной 10 % от основного фонда:

$$З_{доп} = 0,1 \cdot 2\,073\,600 = 207\,360,0 \text{ руб.}$$

Общий фонд заработной платы рассчитывается по формуле:

$$З_{общ} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (K.5)$$

$$З_{общ} = 2\,073\,600 + 207\,360 = 2\,280\,960,0 \text{ руб.},$$

В пересчете на 1 т продукции $З_{общ} = 7603,2 \text{ руб.}$

Отчисления на социальные нужды от заработной платы основных производственных рабочих:

$$P_{соц} = 0,3 \cdot 7603,2 = 2281,0 \text{ руб.}$$

Расходы по содержанию и эксплуатации оборудования принимаем в размере 80 % от заработной платы основных рабочих:

$$P_{обор} = 0,8 \cdot 7603,2 = 6082,6 \text{ руб.}$$

Общехозяйственные расходы принимаем в размере 250 % от заработной платы основных рабочих:

$$P_{ох} = 2,5 \cdot 7603,2 = 19\,008,0 \text{ руб.}$$

Стоимость дополнительного оборудования: в нашем случае принципиально новое оборудование для производства готового продукта не требуется

(используются стандартные танки, сепараторы и т.д., перечисленные в таблице 5.2). Затраты на производство самих микрокапсул уже заложены в повышенную стоимость ингредиента (капсулированной закваски). Поэтому для обеих технологий:

$$P_{\text{доп}} = 0 \text{ руб.}$$

Производственная себестоимость продукции определяется по формуле:

$$C_{\text{произв}} = C + C_{\text{всп}} + Z_{\text{общ}} + P_{\text{соц}} + P_{\text{обор}} + P_{\text{доп}} + P_{\text{ох}} \quad (\text{К.6})$$

$$\begin{aligned} C_{\text{с.произв}} &= 55700,0 + 5570,0 + 7603,2 + 2281,0 + 6082,6 + 0 + 19008,0 \\ &= 96\,244,8 \text{ руб.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} C_{\text{к.произв}} &= 61250,0 + 6125,0 + 7603,2 + 2281,0 + 6082,6 + 0 + 19008,0 \\ &= 102\,349,8 \text{ руб.} \end{aligned}$$

Коммерческие расходы принимаем в размере 10 % от производственной себестоимости:

$$C_{\text{с.ком}} = 0,1 \cdot 96244,8 = 9\,624,5 \text{ руб.}$$

$$C_{\text{к.ком}} = 0,1 \cdot 102349,8 = 10\,235,0 \text{ руб.}$$

Полная себестоимость продукции определяется по формуле:

$$C_{\text{полн}} = C_{\text{произв}} + C_{\text{ком}}. \quad (\text{К.7})$$

$$C_{\text{с.полн}} = 96244,8 + 9624,5 = 105\,869,3 \text{ руб.}$$

$$C_{\text{к.полн}} = 102349,8 + 10235,0 = 112\,584,8 \text{ руб.}$$

Затраты на 1 рубль товарной продукции определим по формуле:

$$Z = C_{\text{полн}} / Ц, \quad (\text{К.8})$$

где Ц – действующая оптовая цена за 1 т продукта, руб.

$$Z_{\text{с}} = 105869,3 / 130\,000 = 0,81 \text{ руб.}$$

$$Z_{\text{к}} = 112584,8 / 150\,000 = 0,75 \text{ руб.}$$

Рассчитаем прибыль от реализации 1 т продукта по формуле:

$$П = Ц - C_{\text{полн}}. \quad (\text{К.9})$$

$$П_{\text{с}} = 130000 - 105869,3 = 24\,130,7 \text{ руб.}$$

$$П_{\text{к}} = 150000 - 112584,8 = 37\,415,2 \text{ руб.}$$

Уровень рентабельности производства найдем по формуле:

$$P = (\Pi / C_{\text{полн}}) \cdot 100 \quad (\text{К.10})$$

$$P_c = (24130,7 / 105869,3) \cdot 100 = 22,8 \%$$

$$P_k = (37415,2 / 112584,8) \cdot 100 = 33,2 \%$$