

УДК 663.1

## Жизнеспособность иммобилизованной микрокапсулированием культуры *Bifidobacterium bifidum* в кисломолочном напитке и смоделированных желудочно-кишечных жидкостях

Т. В. Вобликова

Ставропольский государственный аграрный университет, г. Ставрополь, Россия;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-8414>, e-mail: [tppshp@mail.ru](mailto:tppshp@mail.ru)

*Информация о статье*

Поступила в редакцию  
09.06.2019;

получена после  
доработки  
02.08.2019

*Ключевые слова:*

пробиотики,  
микрокапсулирование,  
кисломолочный напиток,  
овечьё молоко

*Реферат*

Существующие технологии обогащенных кисломолочных напитков предполагают обогащение продукта живыми микроорганизмами, так называемыми пробиотиками, в основном лактобациллами и бифидобактериями. Однако жизнеспособность пробиотиков и качество многих обогащенных пробиотиками продуктов по-прежнему представляют собой серьезную проблему, поскольку количество жизнеспособных пробиотиков и особенно бифидобактерий уменьшается в молочных продуктах во время хранения и впоследствии во время желудочно-кишечного транзита. Для защиты пробиотических культур в процессе обработки, хранения в пищевых продуктах и во время желудочно-кишечного транзита исследовалась одна из инновационных технологий – микроинкапсуляция. Целью исследования было изучение влияния иммобилизации *Bifidobacterium bifidum* в структуре альгинатных микрокапсул на жизнеспособность штамма в процессе хранения в кисломолочном напитке и воздействия на него смоделированных желудочно-кишечных жидкостей. Объектом исследования стали штамм *Bifidobacterium bifidum* 791, иммобилизованный микрокапсулированием в альгинатную матрицу, и микрокапсулы, состоящие из природных биodeградируемых природных полимеров. Исследовано влияние альгинатной матрицы на морфологические особенности *Bifidobacterium bifidum* 791 в результате микроинкапсуляции. В микропрепарате не отмечено инвазивных измененных форм, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния состава микрокапсулы на бифидобактерии. Установлено значительное снижение количества жизнеспособных бифидобактерий в модельной среде желудка (pH 1,2) до 62,2 % в образце, не защищенном микрокапсулой. В образце иммобилизованного *Bifidobacterium bifidum* 791 в структуру гидрогеля альгината происходило снижение концентрации жизнеспособных бифидобактерий на 37,5 % от исходной концентрации при прохождении модельной среды желудка (pH 1,2). Полученные микрокапсулы имели замкнутую поверхность и средний диаметр 150 мкм. Концентрация клеток бифидобактерий в кисломолочном напитке, содержащем инкапсулированные пробиотики, не снижалась ниже рекомендуемого уровня ( $10^6$ – $10^7$  КОЕ/г) в течение 14 дней хранения. Кисломолочный напиток отвечал требованиям Технического регламента Таможенного союза "О безопасности молока и молочных продуктов" (ТС ТР 033/2013) по физико-химическим показателям.

*Для цитирования*

Вобликова Т. В. Жизнеспособность иммобилизованной микрокапсулированием культуры *Bifidobacterium bifidum* в кисломолочном напитке и смоделированных желудочно-кишечных жидкостях. Вестник МГТУ. 2019. Т. 22, № 3. С. 305–313. DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-305-313.

## Viability of the culture of *Bifidobacterium bifidum* immobilized by microencapsulation in dairy drink and the simulated gastrointestinal liquids

Tatyana V. Voblikova

Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-8414>, e-mail: [tppshp@mail.ru](mailto:tppshp@mail.ru)

*Article info*

Received  
09.06.2019;  
received in revised  
02.08.2019

*Key words:*

probiotics,  
microencapsulation,  
dairy drink,  
sheep milk

*Abstract*

The existing technologies of the enriched dairy drinks assume enrichment of a product by live microorganisms, so-called probiotics, generally lactobacilli and bifidobacteria. However, the viability of probiotics and quality of many products enriched with probiotics still represent a serious problem as the quantity of viable probiotics and especially bifidobacteria decreases in dairy products in storage time and subsequently during gastrointestinal transit over time. To protect pro-biotic cultures during processing, storage in foodstuff and gastrointestinal transit, innovative technologies, such as microencapsulation have been investigated. The aim of the research is to study the effect of the immobilization of *Bifidobacterium bifidum* in the structure of alginate microcapsules on the strain viability during storage in a fermented milk drink and the effects of simulated gastrointestinal fluids on it. Objects of researching are the strain of *Bifidobacterium bifidum* 791 immobilized by microencapsulation in the alginate matrix and microcapsules consisting of the natural biodegraded natural polymers. Influence of the alginate matrix on morphological features of *Bifidobacterium bifidum* 791 as a result of microencapsulation has been investigated. In micromedicine the foreign currency changed forms are not noted that demonstrates lack of negative impact of structure of the microcapsule on bifidobacteria. Considerable decrease in quantity of viable bifidobacteria in the model environment of a stomach (pH 1.2) to 62.2 % in the sample which is not protected by the microcapsule has been found. In the immobilized *Bifidobacterium bifidum* 791 sample decreasing in concentration of viable bifidobacteria has happened in structure of alginate hydrogel for 37.5 % of initial concentration when passing the model environment of stomach (pH 1.2). The received microcapsules have the closed surface and average diameter of 150 microns. Concentration of bifidobacteria cages in the yogurt containing the encapsulated probiotics does not decrease below the recommended level ( $10^6$ – $10^7$  colony forming units per gram) within 14 days of storage. Dairy drink has met the requirements of Technical regulations of the Customs union "About safety of milk and dairy products" for physical and chemical indicators.

*For citation*

Voblikova, T. V. 2019. Viability of the culture of *Bifidobacterium bifidum* immobilized by microencapsulation in dairy drink and the simulated gastrointestinal liquids. *Vestnik of MSTU*, 22(3), pp. 305–313. (In Russ.) DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-305-313.

## Введение

Пробиотики характеризуются как живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина. Кисломолочные напитки являются одними из старейших продуктов и самыми распространенными молочными продуктами, потребляемыми во всем мире. С годами потребители осознали преимущества употребления ферментированных продуктов, содержащих пробиотики. Целью их производства и потребления является улучшение здоровья и снижение частоты возникновения желудочно-кишечных заболеваний (McClements et al., 2009). Растущая популярность обогащенных кисломолочных напитков побуждает предприятия пищевой промышленности и исследователей разрабатывать способы повышения ценности продуктов для привлечения потребителей, заботящихся о своем здоровье (Coghetto et al., 2016). В настоящее время разработаны технологии обогащенных молочных напитков, которые предполагают обогащение продукта живыми микроорганизмами, так называемыми пробиотиками: в основном лактобациллами и бифидобактериями. Однако жизнеспособность пробиотиков и качество многих обогащенных пробиотиками продуктов по-прежнему представляют собой серьезную проблему, поскольку количество жизнеспособных пробиотиков и особенно бифидобактерий со временем уменьшается в молочных продуктах во время хранения и впоследствии во время желудочно-кишечного транзита. Плохая выживаемость и жизнеспособность бифидобактерий в кисломолочных напитках приводит к количеству менее  $10^6$ – $10^7$  КОЕ/г, необходимому для оказания пользы для здоровья (Coghetto et al., 2016).

На выживаемость пробиотиков в ферментированных продуктах влияет целый ряд факторов, в том числе pH, растворенный кислород, температура хранения и последующее подкисление. Чтобы защитить пробиотические культуры во время обработки, хранения в пищевых продуктах и во время желудочно-кишечного транзита, были исследованы инновационные технологии, такие как микроинкапсуляция. Микроинкапсуляция может изменять цвет, форму, объем, чувствительность к давлению, чувствительность к теплу и светочувствительность инкапсулированного вещества. В настоящее время микрокапсуляция применяется в различных областях промышленности, таких как пищевая, текстильная, фармацевтическая, косметическая и агрохимическая отрасли (Krasaekoopt et al., 2014; Xiao et al., 2014; Huang et al., 2006; Bae et al., 2008; Scalia et al., 2011; Lam et al., 2012; 2014; Alonso et al., 2014; Onwulata, 2013; Трубников и др., 2015; Просеков и др., 2018; Ганина и др., 2012). Этот метод позволяет улучшить и/или модифицировать характеристики и свойства активного материала, а также его защиту, стабилизацию и медленное высвобождение.

Цель исследования – изучение влияния иммобилизации *Bifidobacterium bifidum* в структуре альгинатных микрокапсул на жизнеспособность штамма в процессе воздействия смоделированных желудочно-кишечных жидкостей и хранения в кисломолочном напитке из овечьего молока.

## Материалы и методы

Объектом исследования являются штамм *Bifidobacterium bifidum* 791 (ООО "Экополис", г. Ковров), иммобилизованный микрокапсулированием в альгинатную матрицу, и микрокапсулы, состоящие из природных биodeградируемых полимеров. Были проведены исследования, направленные на изучение возможности микрокапсулирования бифидобактерий в альгинатном геле методом экструзии. Таким образом, исследовались микрокапсулы, содержащие бифидобактерии и резистентный крахмал в структуре микрокапсулы и без него. Высушенные и увлажненные микрокапсулы оценивали для количественного определения их среднего диаметра и распределения по размерам, а также характеристики их морфологии.

Способ получения бактериального концентрата бифидобактерий не ниже  $10^9$  в жидкой форме предусматривал приготовление питательной среды для культивирования бифидобактерий. В приготовленную питательную среду вносили сублимированную культуру штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 и культивировали при температуре 37–38 °С до получения микробной массы с содержанием бифидобактерий не менее  $10^8$  КОЕ/мл. Далее производили второй пассаж, который предусматривал внесение 10 % выращенной культуры штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 в среду культивирования и накопления при температуре 37–38 °С. Третий пассаж предусматривал внесение 10 % выращенной культуры штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 в среду культивирования и накопления при температуре 37–38 °С в течение 6 ч. Затем происходило центрифугирование при температуре 4 °С в течение 20 мин при 5000 об/мин. Полученный бактериальный концентрат содержал не менее  $10^{10}$  КОЕ/мл. Он использовался для получения микрокапсул.

Микрокапсулы были получены в соответствии с технологией экструзии. Основой для получения микрокапсул являлись растворы, один из которых содержал 1 % альгината натрия + 1 % резистентного крахмала, второй – 1 % альгината натрия. После полной дисперсии полимеров в растворы добавляли штамм *Bifidobacterium bifidum* 791; поликомпонентный состав распыляли в 0,1М CaCl<sub>2</sub> при помощи аэрографа, соединенного с воздушным компрессором. Образовавшиеся частицы перемешивали в течение 30 мин в растворе CaCl<sub>2</sub> для обеспечения полного гелеобразования, затем удаляли из раствора.

Определение специфической активности капсулированных пробиотиков проводили согласно МР 1.2.2566-09 "Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*", ОФС.1.2.1.0005.15 "Растворимость"<sup>1</sup>.

Кислую среду желудка моделировали, добавляя в стерильный физиологический раствор ацидин-пепсин 0,5 мг/мл (регистрационный номер ЛС-001355; производство РУП "Белмедпрепараты", Минск (Беларусь)), каждая таблетка содержит в себе 50 мг протеолитического фермента пепсина и 200 мг ацидина и 0,1М раствор HCl до pH 2,0, что соответствует усредненной кислотности желудочного сока [Государственная фармакопея ССС изд. XI]. Содержимое тонкого кишечника создавали, добавляя 2,5 мг/мл панзинорм форте 20000 (регистрационный номер П № 014602 / 01; производство ООО "КРКА-РУС", г. Истра Московской области (Россия)). В соответствии с МР 1.2.2566-09 "Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*"<sup>2</sup> стерильными 0,1М растворами гидроксида натрия и HCl регулировали pH.

Методика изучения выживаемости пробиотических микроорганизмов в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека, состоит в инкубации микроорганизмов при температуре 37±1 °С последовательно в кислой модельной среде с ацидин-пепсином (pH 2,0) и щелочной модельной среде с панзинорм форте 20000 (pH 6,8–5,8) в течение среднего времени пребывания смешанной пищи, соответственно в желудке и кишечнике, с последующим определением числа выживших микроорганизмов по образованию колониеобразующих единиц бифидобактерий (КОЕ/г) в рядах десятикратных предельных разведений согласно МУК 4.2.999-00, МУК 4.2.2602-10, ГОСТ Р 4.1.1672-03 и ОФС "Определение специфической активности пробиотиков"<sup>3</sup>.

Для исследования защитных свойств микрокапсул из биodeградируемых полимеров на бифидобактерии использовали растворы с градиентом pH: pH 1,2 – моделирование среды желудка с экспозицией 30–120 мин; pH 4,5 – моделирование среды 12-перстной кишки с экспозицией 15–60 мин; pH 6,8 – моделирование среды тощей кишки с экспозицией 60–120 мин; pH 7,2 – моделирование среды подвздошной кишки с экспозицией 60–120 мин; pH 5,8 – моделирование среды толстого кишечника до 18 ч, при температуре 37±1 °С с периодическим перемешиванием круговыми движениями флаконов с исследуемым материалом. В каждой временной точке проводили отбор проб для определения выживаемости бифидобактерий в моделях желудка и кишечника с титрованием методом десятикратных серийных разведений от 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-1</sup> КОЕ/г в двух параллельных рядах пробирок. Инокулированную полужидкую питательную среду для культивирования и выделения бифидобактерий (ФБУН "ГНЦ ПМБ", г. Оболensk) термостатировали при 37 ± 1 °С в течение 72 ч.

На основании МР 1.2.2566-09 "Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*"<sup>4</sup> при отсутствии достоверных отличий в количестве КОЕ/г контрольных и опытных образцов делается вывод об отсутствии влияния испытуемой концентрации вещества модельной среды желудка и кишечника в модели *in vitro*; в случае достоверного уменьшения КОЕ/г в испытуемых образцах по сравнению с контролем не менее чем на один логарифмический порядок, делается вывод об ингибирующем действии веществ в модели *in vitro*.

Общую морфологию микрокапсул определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (SEM) (MIRA3, TESCAN). Микрокапсулы помещались на подложку столика микроскопа с помощью двухсторонней ленты, покрытой золотым напылением. Ускоряющее напряжение микроскопа 5 кВ. Диаметры микрокапсул определяли с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США). Средний диаметр определялся путем измерения 100 микрокапсул.

Исследовали сохранение жизнеспособности бифидобактерий в процессе хранения кисломолочного напитка из овечьего молока при 4 °С в течение 21 дня. Кисломолочный напиток был получен из овечьего молока, пастеризованного при 63 °С в течение 30 мин перед изготовлением с применением *Streptococcus ssp. thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (ФГУП "Экспериментальная биофабрика", г. Углич).

<sup>1</sup> МР 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo* : методические рекомендации. М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 ; ОФС.1.2.1.0005.15. Растворимость : общая фармакопейная статья.

<sup>2</sup> Там же.

<sup>3</sup> МУК 4.2.999-00. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах : методические указания. М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000 ; МУК 4.2.2602-10. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков : методические указания. М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 ; ГОСТ Р 4.1.1672-03. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М., 2004 ; ОФС.1.7.2.0009.15. Определение специфической активности пробиотиков : общая фармакопейная статья.

<sup>4</sup> МР 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo* : методические рекомендации. М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.

Все опыты были выполнены не менее чем в трех повторностях. Объективность выбора количества повторностей опытов и минимальный объем выборки при получении результатов представленных исследований определялся на основании статистической обработки экспериментальных данных, обеспечивающих статистическую надежность 0,95 (или 95 %) и уровень значимости < 0,05 (или 5 %). Статистическая обработка данных выполнялась при помощи многофункционального программного обеспечения Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Исследовано влияние альгинатной матрицы на морфологические особенности *Bifidobacterium bifidum* 791 в результате инкапсуляции. В толще полужидкой питательной среды для культивирования и выделения бифидобактерий производства ФБУН ГНЦ г. Оболенск к 24 ч роста в термостате при температуре  $37 \pm 1$  °С выростали типичные для штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 колонии в виде комет-елочек длиной 5–7 мм, которые показаны на рис. 1, а. Форма колоний штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, имеющих покрытие микрокапсулы, выросших в течение 48 ч в толще полужидкой бифидум-среды после модели желудка и кишечника представлены на рис. 1, б. Форма колоний в препарате, имеющем защитную капсулу, не изменялась (рис. 1, б). В микропрепарате не отмечено инвалютных измененных форм, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния состава микрокапсулы из биodeградируемого природного полимера на бифидобактерии (рис. 1, в).

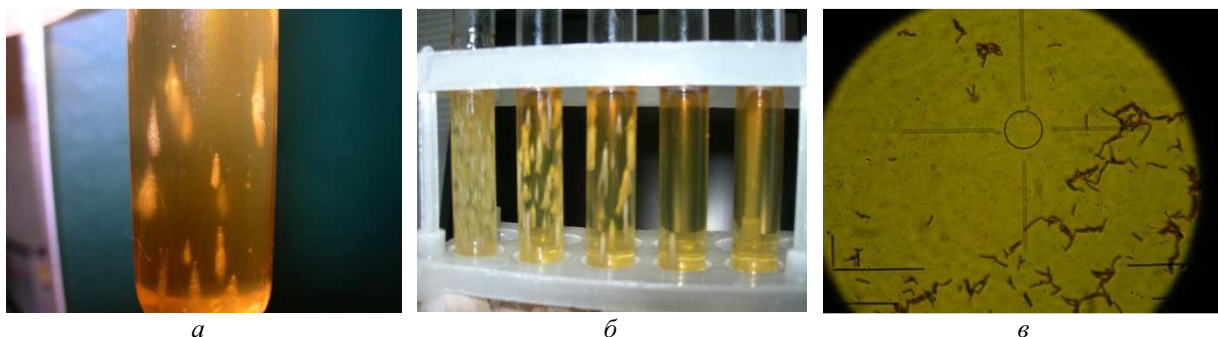


Рис. 1. Особенности роста колоний штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 в полужидкой питательной среде и морфологические особенности клетки штамма подвергнутого микроинкапсулированию: а – колонии в форме кометы-елочки *Bifidobacterium bifidum* 791, суточная культура; б – форма колоний штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, имеющие покрытие микрокапсулы, выросшего в течение 48 ч в толще полужидкой бифидум-среды после модели желудка и кишечника; в – клетки штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, покрытые микрокапсулой, выросшие после обработки в моделях желудка и кишечника  
Fig. 1. Features of the *Bifidobacterium bifidum* 791 colonies' growth in a semi-liquid nutrient medium and the morphological characteristics of the cells of the strain subjected to microencapsulation: а – colonies in the form of the comet-tree *Bifidobacterium bifidum* 791, daily culture; б – the shape of the colonies *Bifidobacterium bifidum* 791, having a coating of microcapsules, grown for 48 hours in a semi-liquid bifidum medium after a model of the stomach and intestines; в – microcapsule coated *Bifidobacterium bifidum* 791 strain cells grown after treatment in models of the stomach and intestines

Результаты изучения выживаемости пробиотических микроорганизмов в альгинатной матрице в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека, представлены на рис. 2–5.

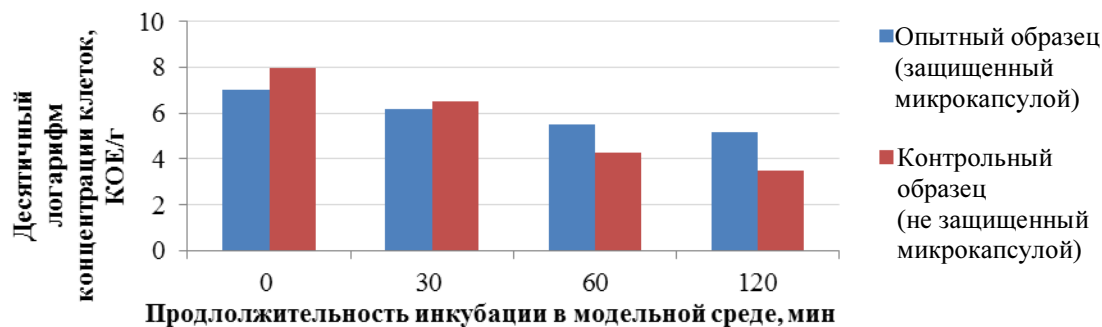


Рис. 2. Выживаемость бифидобактерий в модельной среде желудка, pH 1,2  
Fig. 2. Survival rate of bifidobacteria in the stomach model, pH 1.2

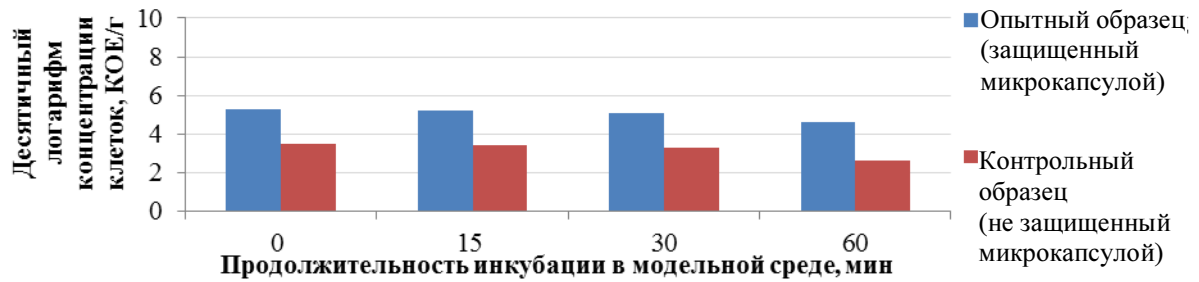


Рис. 3. Выживаемость бифидобактерий в модельной среде 12-перстной кишки, pH 4,5  
Fig. 3. Survival rate of bifidobacteria in the duodenum environment model, pH 4.5

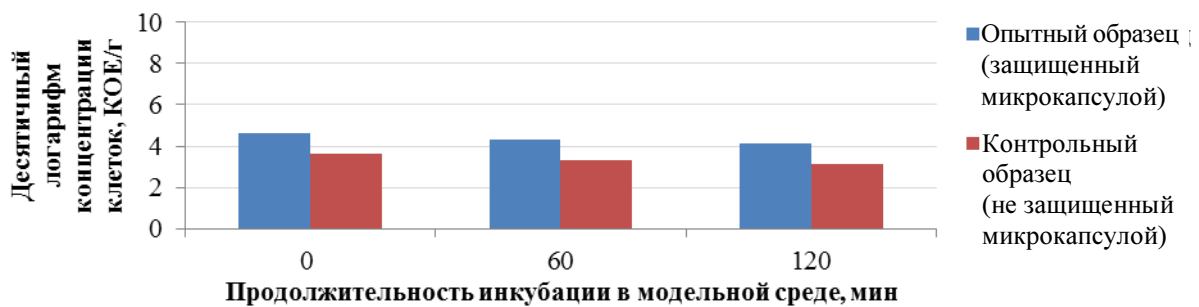


Рис. 4. Выживаемость бифидобактерий в модельной среде тощей кишки, pH 6,8  
Fig. 4. Survival rate of bifidobacteria in the jejunum environment model, pH 6.8

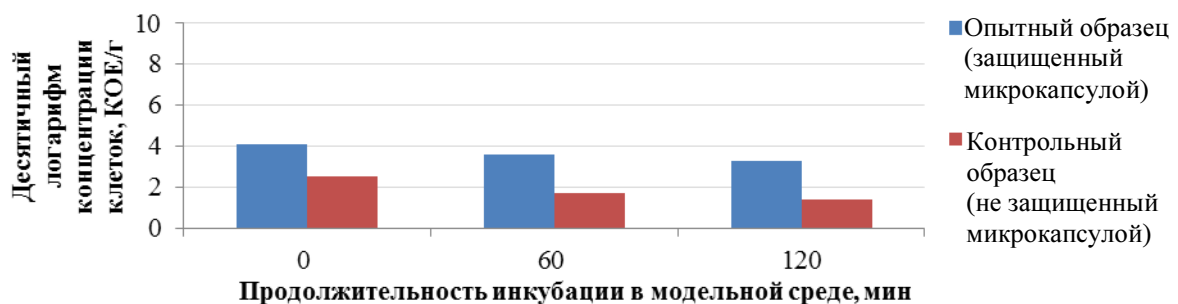


Рис. 5. Выживаемость бифидобактерий в модельной среде подвздошной кишки, pH 7,2  
Fig. 5. Survival rate of bifidobacteria in the ileum environment model, pH 7.2

Данные исследований, представленные на рис. 2, демонстрируют значительное снижение количества жизнеспособных бифидобактерий – до 62,2 % в контрольном образце, не защищенном микрокапсулой на основе альгината. В образце иммобилизованного *Bifidobacterium bifidum* 791 в структуре гидрогеля альгината снижение концентрации жизнеспособных клеток бифидобактерий происходит только на 37,5 % от исходной концентрации при прохождении модельной среды желудка (pH 1,2). Это подтверждает протективное воздействие биодеградируемого природного полимера на бифидобактерии при прохождении их через модель *in vitro* желудка.

Однако снижение общего количества бактерий до 4,0 lg КОЕ/г в градиентах кислотности в моделях желудка и кишечника потребовало увеличения исходной концентрации активированной культуры, подвергающейся микрокапсулированию, не менее чем до  $10^9$  КОЕ/г.

Для получения концентрации бифидобактерий не ниже  $10^9$  в жидкой форме использовалась питательная среда для культивирования бифидобактерий. В приготовленную питательную среду вносили сублимированную культуру штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 и культивировали при температуре 37–38 °С до получения микробной массы с содержанием бифидобактерий не менее  $10^8$  КОЕ/мл. Далее производили второй пассаж. Второй пассаж предусматривал внесение 10 % выращенной культуры

штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 в среду культивирования и накопления при температуре 37–38 °С. Третий пассаж предусматривал внесение 10 % выращенной культуры штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 в среду культивирования и накопления при температуре 37–38 °С в течение 6 ч. Затем производили центрифугирование при температуре 4 °С в течение 20 мин при 5000 об/мин. Полученный бактериальный концентрат содержал не менее 10<sup>10</sup> КОЕ/мл культуры штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 и использовался для получения микрокапсул.

Иммобилизация бифидобактерий в альгинате защищает их от агрессивных внешних факторов. Микросферы, полученные на основе альгината, характеризовались пористой структурой и не обеспечивали необходимой защиты бифидобактерий от агрессивных внешних факторов, о чем свидетельствует снижение жизнеспособности инкапсулированных бифидобактерий в результате прохождения модельных сред желудка и кишечника.

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами некоторых исследований, свидетельствующих о том, что микрокапсулы на основе альгината могут обеспечить ограниченную защиту пробиотиков из-за его специфических свойств. Например, микрокапсулы, полученные методом экструзии с использованием альгината в качестве основного носителя и биополимера, не являются стабильными в кислой среде. Кроме того, микросферы, полученные на основе альгината, характеризуются пористой структурой, обеспечивают легкую диффузию кислоты внутрь и из микросфер. Эти недостатки могут быть эффективно устранены путем смешивания альгината с другими полимерами или применения структурной модификации альгината с использованием различных добавок (*Hassan et al., 2014*).

Для повышения стабильности бифидобактерий в состав биodeградируемых микрокапсул вводился резистентный крахмал. Введение резистентного крахмала в структуру микрокапсул способствовало улучшению защиты и сохранению жизнеспособности микрокапсулированных бифидобактерий до 87 % от исходной концентрации при прохождении модельных сред, имитирующих процесс пищеварения человека. Полученные данные согласуются с результатами некоторых исследователей, которые также сообщали о более высокой выживаемости бактерий в альгинатных микрокапсулах, содержащих природные полимеры (фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды / инулин, фруктоолигосахариды, моносахариды и галактоолигосахариды соответственно), в смоделированных суровых условиях желудочно-кишечного тракта по сравнению с микрочастицами альгината без пребиотиков (*Coghetto et al., 2016; Burgain et al., 2011*).

Разработанный способ получения микрокапсул на основе биodeградируемых нетоксичных полимеров природного происхождения позволил получить микрокапсулы с замкнутой поверхностью. Лиофилизированные микрочастицы имели средний диаметр 150 мкм (матрица из альгината и резистентного крахмала) и 97 мкм (альгинатная матрица), микроструктура поверхности микрокапсул представлена на рис. 6.

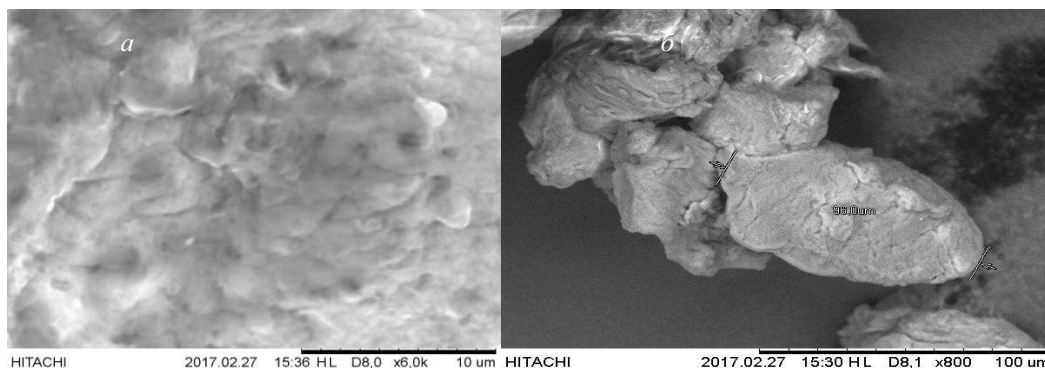


Рис. 6. Морфология и микроструктура лиофилизированных микрочастиц (альгинат + резистентный крахмал), полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии:

*a* – поверхность микрочастицы; *b* – микрочастицы (альгинат + резистентный крахмал)

Fig. 6. Morphology and microstructure of lyophilized microparticles (alginate + Hi-Maize) obtained using scanning electron microscopy: *a* – the surface of the microparticles; *b* – the microparticles (alginate + Hi-Maize)

Исследование сохранения жизнеспособности бифидобактерий в процессе хранения кисломолочного напитка из овечьего молока проводилось при 4 °С в течение 21 дня. Кисломолочный напиток был получен из овечьего молока, пастеризованного при 63 °С в течение 30 мин перед изготовлением с применением *Streptococcus ssp. thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*.

Стоит отметить более высокие уровни фактического количества жизнеспособных клеток, инкапсулированных в модифицированной альгинатной матрице в процессе хранения кисломолочного напитка из овечьего молока при +4 °С (рис. 7).

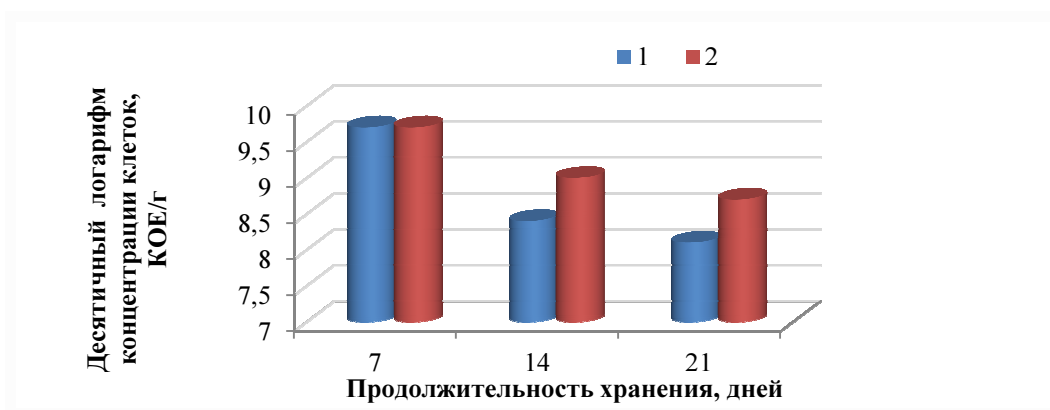


Рис. 7. Выживание культуры свободной и инкапсулированной *Bifidobacterium bifidum* 791 в кисломолочном напитке из овечьего молока при 4 °С в течение 21 дня: 1 – свободная; 2 – инкапсулированная

Fig. 7. Survival of culture of the free and encapsulated *Bifidobacterium bifidum* 791 in dairy drink from sheep milk at 4 °C within 21 days: 1 – free; 2 – encapsulated

Концентрация клеток бифидобактерий в кисломолочном напитке, содержащем инкапсулированные пробиотики, не снижалась ниже рекомендуемого уровня ( $10^7$  КОЕ/г) в течение 21 дня хранения. Титруемая кислотность на седьмые сутки хранения кисломолочного напитка – от 75 до 88 °Т. Кисломолочный напиток отвечал требованиям Технического регламента Таможенного союза "О безопасности молока и молочных продуктов" (ТС ТР 033/2013)<sup>5</sup> по физико-химическим показателям.

#### Заключение

Исследовано влияние альгинатной матрицы на морфологические особенности *Bifidobacterium bifidum* 791 в результате микроинкапсуляции. В микропрепарате не отмечено инвалютных измененных форм, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния состава микрокапсулы на бифидобактерии. Установлено, что в модельной среде желудка (рН 1,2) происходит значительное снижение количества жизнеспособных бифидобактерий – до 62,2 % в образце, не защищенном микрокапсулой. В образце иммобилизованного *Bifidobacterium bifidum* 791 в структуре гидрогеля альгината снижение концентрации жизнеспособных бифидобактерий происходило на 37,5 % от исходной концентрации при прохождении модельной среды желудка (рН 1,2). Исследовано влияние резистентного крахмала на процесс иммобилизации бифидобактерий. Резистентный крахмал в сочетании с альгинатом оказывает синергическое действие на гелеобразование, обеспечивая дополнительную защиту пробиотических клеток. Для повышения стабильности бифидобактерий в состав биодеградируемых микрокапсул вводился резистентный крахмал. Введение резистентного крахмала в структуру микрокапсул способствовало улучшению защиты и сохранению жизнеспособности микрокапсулированных бифидобактерий до 87 % от исходной концентрации при прохождении модельных сред, имитирующих процесс пищеварения человека. Исследованы морфологические характеристики микрочастиц с помощью сканирующей электронной микроскопии. Микрочастицы имели средний диаметр 150 и 97 мкм. Концентрация клеток бифидобактерий в кисломолочном напитке, содержащем инкапсулированные пробиотики, не снижалась ниже рекомендуемого уровня ( $10^6$ – $10^7$  КОЕ/мл или г) в течение 21 дня хранения. Кисломолочный напиток отвечал требованиям Технического регламента Таможенного союза "О безопасности молока и молочных продуктов" (ТС ТР 033/2013) по физико-химическим показателям.

#### Благодарности

За помощь в подготовке статьи выражаем благодарность исполняющей обязанности руководителя лаборатории биологии бифидобактерий ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, канд. биол. наук Ольге Геннадьевне Жиленковой.

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках первого этапа (подэтап № 1) грантовой программы "Старт" Фонда содействия инновациям по договору № 1402/ГС1/22672 о предоставлении гранта на проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ от 20.07.2016 г. ООО "БИОМИЛКЮГ" по теме "Разработка биотехнологии кисломолочного напитка с использованием иммобилизованных пробиотических культур микроорганизмов".

<sup>5</sup> Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 033/2013) : принят решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67.

### Библиографический список

- Ганина В. И., Ананьева Н. В., Захарченко А. В. Иммобилизация пробиотических микроорганизмов на бионосителях // Молочная промышленность. 2012. № 2. С. 57–58.
- Просеков А. Ю., Вобликова Т. В. Иммобилизация бифидобактерий для повышения их жизнеспособности при пероральной доставке в матрице пищевых продуктов // Современная наука и инновации. 2018. № 3 (23). С. 141–146.
- Трубников Д. В., Сеин О. Б., Кролевец А. А., Стариков В. А. Научное обоснование применения микрокапсулированных пробиотических препаратов в животноводстве // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. № 4. С. 62–65.
- Alonso M. L., Laza J. M., Alonso R. M., Jiménez R. M. [et al.]. Pesticides microencapsulation. A safe and sustainable industrial process // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2014. Vol. 89, Iss. 7. P. 1077–1085. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.4204>.
- Bae E. K., Lee S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin // Journal of Microencapsulation. 2008. Vol. 25, Iss. 8. P. 549–560. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>.
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications: Review // Journal of Food Engineering. 2011. Vol. 104, Iss. 4. P. 467–483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.
- Coghetto C. C., Vasconcelos C. B., Brinques G. B., Ayub M. A. Z. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue // Brazilian Journal of Microbiology. 2016. Vol. 47, Iss. 4. P. 941–948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.003>.
- Hassan A., Nawaz Ch. M., Rasco B. Microencapsulation, survival and adherence studies of indigenous probiotics // African Journal of Microbiology Research. 2014. Vol. 8, Iss. 8. P. 766–775. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6182>.
- Huang H.-J., Yuan W.-K., Chen X. D. Microencapsulation based on emulsification for producing pharmaceutical products: A literature review // Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing. 2006. Vol. 14, Iss. 3–4. P. 515–544. DOI: <https://doi.org/10.1002/apj.5500140318>.
- Krasaekoopt W., Watcharapoka S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice // LWT – Food Science and Technology. 2014. Vol. 57, Iss. 2. P. 761–766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>.
- Lam P. L., Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries: Review // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 178. P. 25–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.028>.
- Lam P.-L., Lee K. K.-H., Wong R. S.-M., Cheng G. Y. M. [et al.]. Development of hydrocortisone succinic acid/and 5-fluorouracil/chitosan microcapsules for oral and topical drug deliveries // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2012. Vol. 22, Iss. 9. P. 3213–3218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.031>.
- McClements D. J., Decker E. A., Park Y., Weiss J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2009. Vol. 49, Iss. 6. P. 577–606. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390902841529>.
- Onwulata C. I. Microencapsulation and functional bioactive foods // Journal of Food Processing and Preservation. 2013. Vol. 37, Iss. 5. P. 510–532. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00680.x>.
- Scalia S., Coppi G., Iannuccelli V. Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane: *In vivo* skin penetration studies // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011. Vol. 54, Iss. 2. P. 345–350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.018>.
- Xiao Z., Liu W., Zhu G., Zhou R. [et al.]. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014. Vol. 94, Iss. 8. P. 1482–1494. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6491>.

### References

- Ganina, V. I., Ananyeva, N. V., Zakharchenko, A. V. 2012. An immobilization of pro-biotic microorganisms on biocarriers. *Dairy Industry*, 2, pp. 57–58. (In Russ.)
- Prosekov, A. Yu., Voblikova, T. V. 2018. An immobilization of bifidobacteria for increase in their viability at oral delivery in a matrix of foodstuff. *Sovremennaa nauka i innovacii*, 3(23), pp. 141–146. (In Russ.)
- Trubnikov, D. V., Sein, O. B., Krovelets, A. A., Starikov, V. A. 2015. Scientific justification of use of the microencapsulated pro-biotic medicines in livestock production. *Vestnik of Kursk State Agricultural Academy*, 4, pp. 62–65. (In Russ.)
- Alonso, M. L., Laza, J. M., Alonso, R. M., Jiménez, R. M. et al. 2014. Pesticides microencapsulation. A safe and sustainable industrial process. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(7), pp. 1077–1085. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.4204>.



- Bae, E. K., Lee, S. J. 2008. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), pp. 549–560. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications: Review. *Journal of Food Engineering*, 104(4), pp. 467–483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.
- Coghetto, C. C., Vasconcelos, C. B., Brinques, G. B., Ayub, M. A. Z. 2016. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), pp. 941–948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.003>.
- Hassan, A., Nawaz, Ch. M., Rasco, B. 2014. Microencapsulation, survival and adherence studies of indigenous probiotics. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), pp. 766–775. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6182>.
- Huang, H.-J., Yuan, W.-K., Chen, X. D. 2006. Microencapsulation based on emulsification for producing pharmaceutical products: A literature review. *Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing*, 14(3–4), pp. 515–544. DOI: <https://doi.org/10.1002/apj.5500140318>.
- Krasaekoopt, W., Watcharapoka, S. 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT – Food Science and Technology*, 57(2), pp. 761–766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>.
- Lam, P. L., Gambari, R. 2014. Advanced progress of microencapsulation technologies: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries: Review. *Journal of Controlled Release*, 178, pp. 25–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.028>.
- Lam, P.-L., Lee, K. K.-H., Wong, R. S.-M., Cheng, G. Y. M. et al. 2012. Development of hydrocortisone succinic acid/and 5-fluorouracil/chitosan microcapsules for oral and topical drug deliveries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(9), pp. 3213–3218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.031>.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), pp. 577–606. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390902841529>.
- Onwulata, C. I. 2013. Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), pp. 510–532. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00680.x>.
- Scalia, S., Coppi, G., Iannuccelli, V. 2011. Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane: *In vivo* skin penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2), pp. 345–350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.018>.
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R. et al. 2014. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), pp. 1482–1494. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6491>.

#### Сведения об авторе

**Вобликова Татьяна Владимировна** – пер. Зоотехнический, 12, г. Ставрополь, Россия, 355017; Ставропольский государственный аграрный университет, канд. техн. наук, доцент; e-mail: [tpshp@mail.ru](mailto:tpshp@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-8414>

**Tatyana V. Voblikova** – 12 Zootekhnicheskoy Lane, Stavropol, Russia, 355017; Stavropol State Agrarian University, Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor; e-mail: [tpshp@mail.ru](mailto:tpshp@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-8414>