

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОБИОТИКОВ КАК МЕТОДА ИХ ЗАЩИТЫ И ДОСТАВКИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ ЧЕЛОВЕКА

Н. Б. Гаврилова¹ , Н. Л. Чернопольская¹ , А. В. Банникова^{2, *} ,
И. А. Евдокимов³ , М. И. Шрамко³

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», 644008, Россия, г. Омск, Институтская площадь, 1

² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Россия, Саратовская область, г. Саратов, Театральная площадь, 1

³ ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», 355009, Россия, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1

Дата поступления в редакцию: 10.07.2017

Дата принятия в печать: 22.06.2018

* e-mail: annbannikova@gmail.com



© Н. Б. Гаврилова, Н. Л. Чернопольская, А. В. Банникова, И. А. Евдокимов, М. И. Шрамко, 2018

Аннотация. Актуальность исследований заключается в экспериментально-аналитическом обосновании эффективности совместного использования биополимеров животного и растительного происхождения в качестве подложки в процессе иммобилизации ассоциации пробиотических культур. Исследования выполнены в специализированных лабораториях университетов: Омского ГАУ, Саратовского ГАУ, СКФУ. В виде подложки использовались: желатин, χ -каррагинан, низкоэтерифицированный пектин, модифицированный крахмал; в качестве биообъектов выбраны: *L. acidophilus*, *B. lactis*, *S. thermophilus*. Для получения достоверных и полных характеристик в работе применялся комплекс методов исследований: физико-химических, сенсорных, микробиологических. Исследование иммобилизации позволило определить оптимальное соотношение биополимеров в качестве носителя (подложки): пектин и желатин, как 2:1; общую концентрацию сухих веществ раствора носителя ($20,0 \pm 0,5$)%. Общее количество жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов в мембранах (пластинах) составляет в среднем $lg(11,0 \pm 0,55)$. С целью продления срока, годности мембраны высушивали на сублимационной сушилке при параметрах: температура замороженного продукта ($-25^\circ C$) и остаточное давление в сублиматоре $0,0133-0,133$ кПа. Изучена иммобилизация микрокапсулированием ассоциации пробиотических культур *L. acidophilus*, *B. lactis* и *S. thermophilus* в гель биополимеров: желатин пищевой, гелю пектин LM 106 AS-YA, крахмал в соотношении 5:1:1. Полученные микрокапсулы исследованы в имитированных желудочных и кишечных условиях. При этом определялось количество жизнеспособных клеток пробиотиков при различном времени их деградации. Установлено, что 20–25% жизнеспособных клеток пробиотиков было выпущено из капсул в фазе «искусственный желудок», 75–80% – в фазе «искусственного кишечника». Приведены инновационные биотехнологии продуктов на молочной основе для специализированного питания.

Ключевые слова. Иммобилизация, пробиотики, штаммы микроорганизмов, ферментативный гидролиз *in vitro*, биотехнологии, специализированное питание

Для цитирования: Исследование иммобилизации пробиотиков как метода их защиты и доставки в желудочно-кишечный тракт человека / Н. Б. Гаврилова, Н. Л. Чернопольская, А. В. Банникова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, № 2. – С. 151–161. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-2-151-161>.

INVESTIGATION OF THE IMMOBILIZATION OF PROBIOTICS AS A METHOD FOR THEIR PROTECTION AND DELIVERY TO THE HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

N.B. Gavrilova¹ , N.L. Chernopolskaya¹ , A.V. Bannikova^{2, *} ,
I.A. Evdokimov³ , M.I. Shramko³

¹ Stolypin Omsk State Agrarian University, 1, Institutskaya square, Omsk, 644008, Russia

² Vavilov Saratov State Agrarian University, 1, Teatralnaya Square, Saratov, 410012, Russia

³ North-Caucasian Federal University, 1 Pushkina Str., Stavropol, 355009, Russia

Received: 10.07.2017

Accepted: 22.06.2018

* e-mail: annbannikova@gmail.com



Abstract. The relevance of research is the experimental and analytical justification of the effectiveness of the joint use of biopolymers of animal and plant origin as a substrate in the process of immobilization of the association of probiotic cultures. Researches are executed in specialized laboratories of universities: Omsk GAU, Saratov GAU, SKFU. In the form of a substrate were used: gelatin, χ -carrageenan, low-esterified pectin, modified starch; as bioobjects are selected: *L. acidophilus*, *B. Lactis*, *S. thermophilus*. To obtain reliable and complete characteristics, a set of research methods was used in the work: physicochemical, sensory, and microbiological. Investigation of immobilization allowed to determine the optimal ratio of biopolymers as a carrier (substrate): pectin and gelatin, as 2:1; the total concentration of solids of the carrier solution (20.0 ± 0.5)% by weight. The total number of viable cells of probiotic microorganisms in membranes (plates) is an average of lg (11.0 ± 0.55). In order to extend the shelf life, the membranes were dried in a freeze dryer, with parameters: the temperature of the frozen product (-25°C) and the residual pressure in the sublimate 0.013–0.133 kPa. Immobilization by microencapsulation of the association of probiotic cultures of *L. acidophilus*, *B. Lactis* and *S. thermophilus* into a gel of biopolymers: gelatin food, pectin gene LM 106 AS-YA, starch in a ratio of 5:1:1 was studied by microencapsulation. The obtained microcapsules were studied in imitated gastric and intestinal conditions, while the number of viable probiotic cells was determined at different times of their degradation. It was established that 20–25% of viable cells of probiotics were released from capsules in the "artificial stomach" phase, 75–80% in the "artificial bowel" phase. Innovative biotechnologies of milk based products for specialized nutrition are presented.

Keywords. Immobilization, probiotics, strains of microorganisms, enzymatic hydrolysis in vitro, biotechnology, specialized nutrition

For citation: Gavrilova N.B., Chernopolskaya N.L., Bannikova A.B., [et al.]. Investigation of the immobilization of probiotics as a method for their protection and delivery to the human gastrointestinal tract. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2018, vol. 48, no. 2, pp. 151–161 (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-2-151-161>.

Введение

О значимости проблемы повышения жизнеспособности клеток микроорганизмов, используемых в технологии ферментированных продуктов, свидетельствуют исследования, проводимые по сохранности и повышению количества жизнеспособных клеток пробиотических культур в процессе технологических операций производства, связанных с механическим и тепловым воздействием, ускоряющие при пассивации отмирания клеток микроорганизмов. Теоретически обосновано и экспериментально изучено влияние отдельных факторов, химических веществ и параметров, активизирующих пробиотические культуры в различных питательных средах, используемых в технологии ферментированных продуктов для специализированного и функционального питания [1, 3].

При отборе пробиотических культур необходимо установить соответствие видовых характеристик путем биохимических и физиологических тестов, которые являются полезными при идентификации бактерий до уровня вида. Так же исследуются живые клетки пробиотических культур с помощью фазового контраста, а клетки, окрашенные по Грамму, – с помощью светового микроскопа [5]. При составлении ассоциации культур необходимо учитывать их симбиотические отношения и степень устойчивости к неблагоприятным факторам для повышения их функциональных свойств.

В рамках развития пищевой биотехнологии в качестве эффективного метода для защиты бактериальных клеток пробиотических культур рекомендуется использовать иммобилизацию [1]. Вследствие чего этот метод рекомендуется для использования в биотехнологических процессах производства пива и вина [1, 6], а также в специализированных и функциональных продуктах питания.

Иммобилизацию клеток проводят различными способами: связыванием на твердом носителе;

включением в структуру носителя с использованием мембранной технологии. Связывание на твердом носителе обычно происходит посредством адсорбции и (или) ковалентного присоединения (в том числе, с использованием бифункциональных реагентов). Среди методов пространственного фиксирования выделяют микрокапсуляцию и наслаивание с использованием мембранной технологии [8, 12, 15, 18].

Перспективным материалом для носителя (подложки) являются полимерные плёнки, волокна, гели. Нерастворимые материалы, которые служат основой для матриц подобных носителей, могут быть органическими или неорганическими соединениями, синтетическими производными или природными продуктами [1].

Результаты исследований иммобилизации отдельных штаммов пробиотических и сопутствующих культур представлены в научных трудах известных ученых [8, 12, 13, 16, 18, 19, 20].

К методам мембранной технологии также относится микрокапсулирование. Внешняя оболочка микросфер – тонкая, непроницаемая для бактерий, но проницаемая для других компонентов искусственная мембрана. При микрокапсулировании капсулы также защищают продукты иммобилизации и образуют комфортную окружающую среду. Капсулы обладают механической прочностью и пригодны для длительного использования.

Данный метод эффективно используется в производстве витаминно-минеральных премиксов в инкапсулированном виде [9]. Так же он изучен, как метод сохранения биологически активных веществ [9, 10, 11, 14].

Гелевый матрикс для иммобилизации микробных клеток может состоять из агара, агарозы, χ -каррагинана, желатины, коллагена и других ингредиентов.

Цель исследования – изучение совместного использования биополимеров животного и растительного происхождения для повышения жизнеспособности иммобилизованных бактериаль-

ных клеток ассоциации пробиотических микроорганизмов.

Объекты и методы исследования

В соответствии с задачами исследования в виде подложки использовались: желатин (ГОСТ 11293-89), χ -каррагинан (ГОСТ 33310-2015), низкоэтерифицированный пектин (ГОСТ Р 51806-2001), модифицированный крахмал (ГОСТ 32902-2014).

Желатин хорошо растворим, его водный раствор образует студень.

Пектин – это водорастворимое вещество, свободное от целлюлозы и состоящее из частично или полностью метоксилированных остатков полигалактуроновой кислоты, высокомолекулярный полисахарид, является пребиотиком.

Крахмал – растительный полисахарид со сложным строением. Крахмал является важным компонентом пищевых продуктов. Неповреждённые крахмальные зёрна плохо растворимы, но он может значительно повысить прочностные характеристики матрицы.

Пищевой каррагинан – это натуральный (природный) гидроколлоид, высокомолекулярное соединение, образующееся из сополимеров солей калия, натрия, магния и кальциевых сернистых эфиров галактозы и 3,6-ангидрогалактозы.

Исследование культур микроорганизмов проводилось на видовом уровне. В качестве биообъектов были выбраны:

- *Lactobacillus acidophilus*, содержащая штамм La-5;
- *Bifidobacterium* содержащая штамм *Bifidobacterium lactis* (BB-12);
- *Bifidobacterium* содержащая штамм *Bifidobacterium longum* (BB-46);
- термофильная культура, содержащая определенный штамм *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*;

Характеристика биообъектов приведена в табл. 1.

Для получения достоверных и полных характеристик исследуемых объектов применяли современные методы исследования.

Физико-химические методы. Активную кислотность (рН) исследуемых систем определяли с помощью иономера ИПЛ-101 (производство Россия).

Динамическую вязкость определяли на ротационном вискозиметре Fungilab SMART (производство Германия).

Для определения активности воды использовали прибор Rawkit (производство США).

Деградация капсул была исследована в ходе имитации модели переваривания в желудочных и кишечных соках.

Модельный желудочный сок: 2%-ный раствор NaCl в воде Millipore, рН 2 (1 М HCl), пепсин 3600 U / мл, температура 37 °С. Образцы инкубировали в водяной бане при постоянном встряхивании в течение заданного периода времени (120 мин).

Модельный кишечный сок: 0,68 % одноосновного фосфата калия; 0,1 % солей желчных кислот; 0,4 % панкреатина, рН 7,5 (0,5 М NaOH), температура 37 °С. Образцы инкубировали в водяной бане при постоянном встряхивании в течение заданного периода времени (\approx 20 мин) [9, 17].

Сушку проводили на сублимационной сушильной установке марки «TG 50» (производство Германия).

Микробиологические методы. Для микробиологических исследований использовались аттестованные в установленном порядке методики выполнения измерений:

– метод предельных разведений с использованием питательных сред – стерильное обезжиренное молоко и агар с гидролизированным обезжиренным молоком;

– метод предельных разведений с использованием среды Blourock.

Для проведения исследований использовали микробиологический бокс с системой очистки TENCAN (производство Китай).

Изучение морфологии микроорганизмов проводилось методом микроскопирования фиксированных и окрашенных фуксином препаратов на микроскопе «Axioskop 40» (производство Германия) при увеличении 10 x 63.

Результаты и их обсуждение

Мировой и национальный (отечественный) опыт свидетельствует о возросшем интересе населения к здоровому питанию, значительной составляющей которого являются продукты пищевые функциональные. Производство продуктов пищевых функциональных – основной мировой тренд пищевой науки и предмет инновационных исследований. Основным отличием продуктов пищевых функциональных является их направленное физиологическое воздействие на организм человека, источник которого – пробиотические микроорганизмы. При этом важным фактором является их видовое соответствие нормальной микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) здорового человека.

Таблица 1 – Характеристика используемых культур

Table 1 – Description of cultures

Вид закваски	Вид микрофлоры	Минимальная клеточная концентрация, КОЕ/г	Оптимальная температура ферментации, °С	Активная кислотность, ед. рН
La-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , штамм La-5	$1 \cdot 10^9$	42 ± 2	5,5–5,8
ST-M7	Определенный штамм <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	$1 \cdot 10^{10}$	40 ± 5	6,0–6,5
BB-12	Тип <i>Bifidobacterium</i> , содержит штамм <i>Bifidobacterium lactis</i>	$1 \cdot 10^{11}$	37 ± 3	6,0

Таблица 2 – Характеристика мембран

Table 2 – Membrane characteristics

Номер опыта (№)	Сухие вещества, %	Вязкость, мПа·с	Активность воды (a_w)	Активная кислотность, pH
1	5,86 ± 0,12	8,2 ± 0,1	0,870	4,37
2	10,41 ± 0,10	10,7 ± 0,1	0,862	4,40
3	13,52 ± 0,15	13,1 ± 0,1	0,858	4,38
4	19,92 ± 0,13	18,5 ± 0,1	0,853	4,40
5	23,14 ± 0,15	24,3 ± 0,1	0,841	4,38

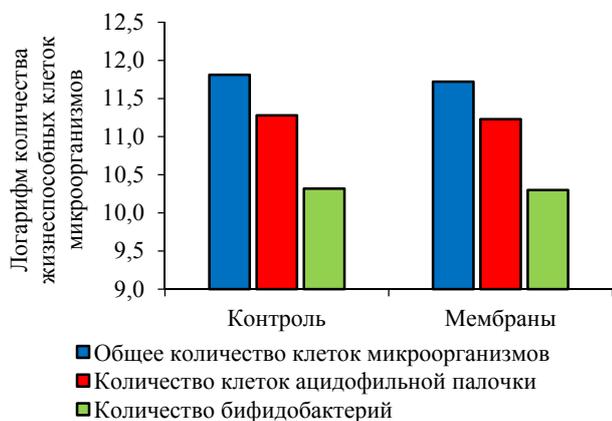


Рисунок 1 – Зависимость логарифма числа живых клеток от условий иммобилизации

Figure 1 – Association between the artificial number of live cells and immobilization conditions

В качестве способа защиты жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов в агрессивных условиях технологического процесса производства и ЖКТ изучен процесс иммобилизации ассоциации пробиотических культур в гидроколлоидные мембраны, которые образуются при использовании метода наслаивания. Значимым объектом исследования является вид носителя (подложки). Следует отметить, что в зависимости от происхождения, химических свойств и биологической активности носителя, возможны следующие результаты иммобилизации методом наслаивания: в случае использования подложкой биополимеров животного или растительного происхождения или их смеси, образуются тонкие пластины (мембраны) с заданными свойствами. Необходимо подчеркнуть, что активность пробиотических культур в мембранах должна быть не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г и хорошо сохраняться в процессе хранения. При растворении мембраны должны иметь период распадаемости ($0,5 \div 1,0$) ч.

Учитывая вышеизложенное, изучено совместное использование биополимеров пектина цитрусового и желатина пищевого. Следует отметить, что данные биополимеры образуют вязкие гели, отличающиеся отличными диффузными свойствами. Активная кислотность процесса гелеобразования соответствует активизации роста пробиотической микрофлоры и составляет pH = 4,0–4,3 ед. Используемые биополимеры так же играют роль пребиотиков, так как содержат глутаминовую кислоту, аргинины, пищевые волокна.

Исследования проводились в специальном боксе в следующей последовательности:

- активизация биомассы клеток пробиотических культур (*L. acidophilus* : *B. lactis* : *S. thermophilus*, в соотношении 1:1:1) на стерилизованном и охлажденном до температуры (38 ± 1) °С обезжиренном молоке, так как оптимальная температура жизнедеятельности монокультур включенных в ассоциацию, представленных в таблице 1, составляет (38 ± 1) °С;

- подготовка смеси биополимеров проводилась в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. При этом в опытах изменялась массовая доля биополимеров от 5 % до 25 % при постоянном соотношении пектина к желатину как 2:1;

- в реакторе ассоциацию пробиотических культур в активизированной форме при температуре (33 ± 1) °С соединяли с гелем биополимеров, перемешивали в течение (15 ± 5) минут;

- затем проводили дозирование полученной смеси в стерильные формы;

- время выдержки форм в условиях специального бокса составляет 15–20 минут. В результате чего, в формах образовались тонкие плёнки (мембраны). Температура хранения мембран (4 ± 2) °С.

Оптимальное количество смеси биополимеров и их соотношения устанавливались путём экспериментов в пятикратной повторности. Результаты обрабатывались с использованием методов математической статистики.

Качество полученных мембран оценивали физико-химическими, сенсорными и микробиологическими методами (таблица 2).

Изучены микробиологические показатели ассоциации культур до иммобилизации (контроль) и после иммобилизации (опыт) (рис. 1).

Анализ данных, представленных на рис. 1, свидетельствует о незначительном снижении степени концентрирования жизнеспособных клеток иммобилизованных культур микроорганизмов в мембранах, что положительно характеризует иммобилизацию как метод защиты клеток в неблагоприятных условиях.

Изучение морфологии микроорганизмов проводилось методом микроскопирования фиксированных и окрашенных фуксином препаратов на микроскопе «Axioskop 40» при увеличении 10 x 63. Результаты исследований представлены на рис. 2 и 3.

Анализ данных, представленных на рисунках, свидетельствует о том, что при включении клеток микроорганизмов в гели, они располагаются равномерно, отсутствуют крупные скопления клеток. Это способствует сохранению высокой активности и стабильности клеток в процессах биосинтеза.

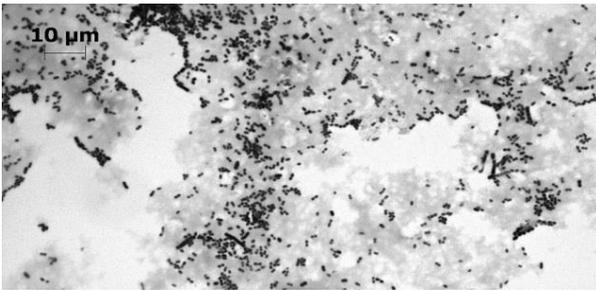


Рисунок 2 – Микроструктура активизированных культур пробиотических микроорганизмов (*L. acidophilus* : *B. lactis* : *S. thermophilus* в соотношении 1:1:1)

Figure 2 – Microstructure of activated probiotic cultures (*L. acidophilus*, *B. lactis* and *S. thermophilus*, ratio 1:1:1)

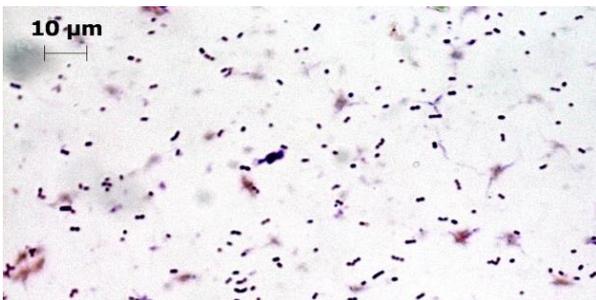


Рисунок 3 – Микроструктура иммобилизованных культур пробиотических микроорганизмов (*L. acidophilus* : *B. lactis* : *S. thermophilus* в соотношении 1:1:1)

Figure 3 – Microstructure of immobilized probiotic cultures (*L. acidophilus*, *B. lactis* and *S. thermophilus*, ratio 1:1:1)

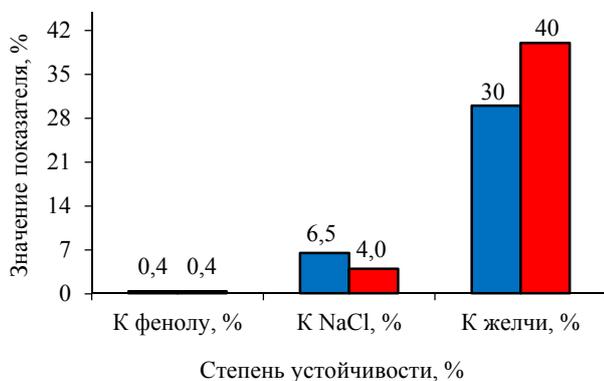


Рисунок 4 – Изучение показателей, характеризующих жизнеспособность пробиотических культур в условиях ЖКТ

Figure 4 – Viability signs of probiotic cultures in gastrointestinal tract conditions

Кроме показателей, представленных на рисунке, определялась степень устойчивости ассоциации пробиотических культур в иммобилизованной форме (опыт) по отношению к контрольному образцу, а также к щелочной реакции среды (ед. pH). Получены следующие данные: контрольный образец 8,3–9,6; опытный образец 8,3–9,2. Гипотетически предположено, что опытный образец более устойчив

к агрессивным условиям ЖКТ за счет комбинации компонентов – протеинов и полисахаридов, концентрируемых в стенках клеток микроорганизмов, содержащих пектины, которые комплектарны соответствующим рецепторам, расположенным на мембранах эпителиальных клеток. Пектины, в данном случае, являются медиаторами адгезии вследствие своей белковой или гликопротеиновой природы. Тем самым они способствуют увеличению числа жизнеспособных клеток ассоциации пробиотических культур.

Другим аспектом исследований являлось формирование сохранения жизнеспособности в желудке у экспериментальной ассоциации пробиотических культур, где количество микробов незначительно из-за его кислой среды, и в кишечнике, в котором для роста микроорганизмов создаются трудности из-за присутствия агрессивных пищеварительных ферментов [7].

Для уточнения качества вышеозначенных свойств были проведены экспериментальные исследования (рис. 4) жизнеспособности пробиотических культур, поступающих в ЖКТ в виде микромембран.

В результате исследований было установлено, что иммобилизованные культуры микроорганизмов проявили устойчивость к исследуемым концентрациям тест-веществ, что может рассматриваться, как косвенный показатель лучшей способности иммобилизованных культур приживаться в желудочно-кишечном тракте человека.

Анализ физико-химических, сенсорных и микробиологических показателей позволяет считать оптимальным количественное соотношение биополимеров в качестве носителя (подложки): пектин и желатин как 2:1; общая концентрация массовой доли сухих веществ раствора носителя ($20,0 \pm 0,5$) %. Микробиологические показатели свидетельствуют о наличии в мембранах (пластинках) жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов в среднем lg ($11,0 \pm 0,55$).

С целью продления срока годности и расширения возможности использования мембран (пластинок) изучен способ консервирования их высушиванием.

В качестве метода обезвоживания опытных мембран использовалась сублимационная сушка (лиофилизация), как один из прогрессивных и эффективных методов сушки пищевой промышленности [1]. В данном случае он выбран для снижения процесса термоинактивации ассоциации пробиотических микроорганизмов и сохранения их жизнеспособности после выхода из анабиотического состояния. Процесс высушивания осуществляли при температуре замороженного продукта ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и остаточном давлении в сублиматоре 0,0133–0,133 кПа на производственной установке TG 50 при следующих параметрах, которые представлены на рис. 5.

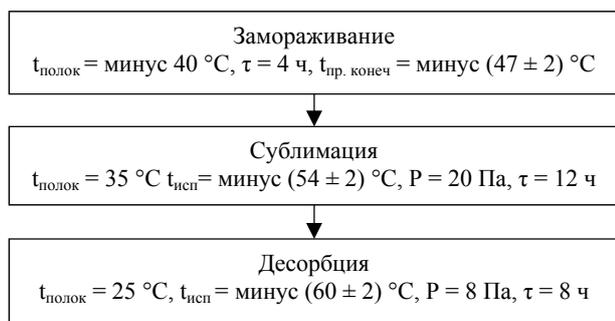


Рисунок 5 – Высушивание опытных образцов мембран на производственной установке TG 50

Figure 5 – Sublimation of check sample membranes in dehydrofreezing unit TG 50

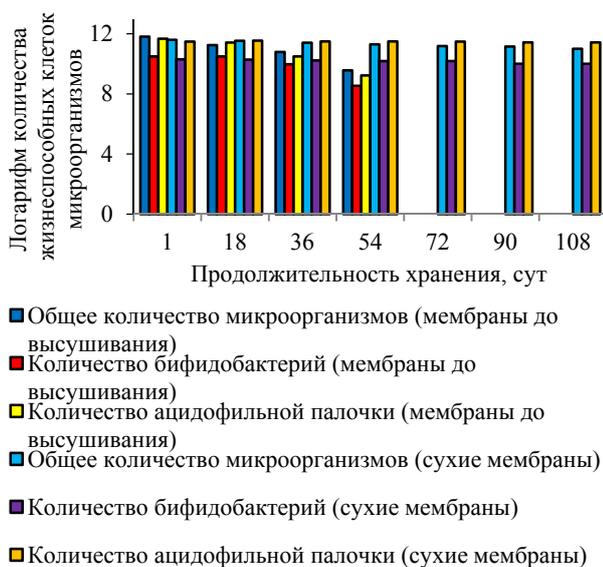


Рисунок 6 – Микробиологические показатели сухих мембран в период хранения

Figure 6 – Microbiological marks of dried membranes during storage period

После высушивания опытные образцы в условиях специального бокса подвергались тонкому измельчению, просеивались и расфасовывались в стерильные сухие флаконы, герметически упаковывались, этикировались и хранились при температуре $(4 \pm 2) \text{ } ^\circ\text{C}$.

В процессе длительного хранения проводились исследования числа клеток пробиотических микроорганизмов в опытных образцах мембран (рис. 6).

Изучение количественного состава микроорганизмов свидетельствует о том, что в течение процесса хранения количество клеток микроорганизмов в мембранах, не подвергнутых сублимационной сушке, уменьшается и при достижении показателя менее 10^7 КОЕ в 1 г снижается с хранения. В сухих мембранах количество микроорганизмов остается неизменным на протяжении всего срока годности. Определён гарантированный срок годности свежих мембран – 18 суток, сухих мембран – 90 суток.

Изложенные выше результаты экспериментальных исследований и их анализ позволяют

считать метод иммобилизации наслаиванием пробиотических культур в гель биополимеров достаточно эффективным.

На следующем этапе изучался процесс иммобилизации микрокапсулированием ассоциации пробиотических культур *L. acidophilus*, *B. lactis* и сопровождающий *S. thermophilus* в соотношении 1:1:1 в гель биополимеров: желатин пищевой, гену пектин LM 106 AS-YA, крахмал в соотношении 5:1:1.

Процесс микрокапсулирования проводился в специальном боксе, где была установлена пилотная установка.

В боксе поддерживались асептические условия, манипуляции проводились через специальные отверстия. Суспензию активизированной ассоциации пробиотических культур соединяли в реакторе с раствором биополимеров при температуре $(38 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ и затем формировали микрокапсулы.

Важным свойством микрокапсул является их доставка в желудочно-кишечный тракт. Эффективность системы доставки пробиотических микроорганизмов иммобилизованных методом микрокапсулирования исследовали в имитированных желудочных (ЖУ) и кишечных условиях (КУ).

При этом определяли следующие показатели: время распада и (или) скорость полного растворения *in vitro*. Эксперимент проводился в искусственном желудочном соке при температуре $(36,5 \pm 0,5) \text{ } ^\circ\text{C}$. Контрольное время, на которое ориентировались при проведении исследований, регламентировано Европейской фармакопеей и составляет 30 мин.

Так как поставлена задача колонизации кишечника жизнеспособными клетками пробиотических микроорганизмов, изучено изменение морфологии микрокапсул в условиях ЖУ (от 30 до 45 мин) и КУ (60 мин).

Для того чтобы оценить, насколько жизнеспособные клетки пробиотиков будут выпущены в желудочно-кишечной среде с различными условиями pH, ионной силы и ферментативной активности, определялось количество жизнеспособных клеток пробиотиков при различном времени их деградации.

Выявлено, что 20–25 % жизнеспособных клеток пробиотиков было выпущено из капсул в фазе «искусственный желудок», 75–80 % – в фазе «искусственного кишечника».

Подтверждено, что использование геля биополимеров желатина пищевого, гену пектина LM 106 AS-YA, крахмала в качестве носителя (подложки) может служить контейнером для инкапсуляции жизнеспособных клеток пробиотиков. Капсулы имели наибольшую концентрацию биологически-активных веществ, что говорит об их лучшей роли в качестве защитного компонента жизнеспособных клеток пробиотиков, а также их контролируемой доставки.

Проведенные исследования показали, что капсулы имели более пористую структуру в условиях «искусственного кишечника», обеспечивающую высвобождение жизнеспособных клеток пробиотиков.

Результаты изучения процесса иммобилизации, полученные экспериментальным путем, и их анализ позволяют считать, что метод наслаивания, так же как и микрокапсулирования жизнеспособных клеток пробиотиков в гель биополимеров животного и растительного происхождения, является эффективным.

Мониторинг, проводимый Институтом статистических исследований и экономики знаний Высшей школы экономики, показал, что пищевые биотехнологии, как область перспективных исследований, признаны глобальным технологическим трендом, а продукты, содержащие пробиотики, при их регулярном потреблении улучшают и стимулируют пищеварение, усиливают иммунитет при их регулярном употреблении [4].

В процессе разработки биотехнологии новых продуктов на молочной основе с использованием пробиотических культур, иммобилизованных в гели биополимеров, были изучены различные способы их обогащения протеинами в виде изолятов, концентратов, гидролизатов, содержащих высокую концентрацию свободных незаменимых аминокислот с разветвленными боковыми цепочками (ВСАА) и пептиды, участвующие в метаболизме мышечной ткани и построении мышечных волокон. Этот факт важно учитывать при создании продуктов для питания спортсменов.

Среди лиц, регулярно занимающихся любительским и профессиональным спортом, значительное количество молодёжи отдаёт предпочтение тяжелой атлетике. Известно, что она является особо энергозатратной. Технология следующего биопродукта относится к продуктам спортивного питания категории А (белково-углеводные продукты – гейнеры). В качестве источника протеина исследован изолят сывороточных белков – высокоочищенная форма (более 85 % белка), не содержащая жира, холестерина и углеводов (лактозы). Изучен процесс подготовки белково-углеводной основы нового продукта путём частичного гидролиза лактозы ферментным препаратом β -галактозидазы грибкового происхождения *Aspergillus niger*, в которую вводились компоненты, регулирующие углеводный состав (мёд натуральный и мальтодекстрин) и функциональные свойства («Пантогематоген Северный», витаминно-

минеральный премикс «Валетек-7»). Процесс ферментации смеси компонентов проводился закваской DVS культуры LAT PB AC (состав: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*) и ассоциативной закваской культур: *L. acidophilus*, *B. lactis*, *S. thermophilus* в иммобилизованной форме. Разработана биотехнология белково-углеводного кисломолочного продукта «Спортивный» для питания спортсменов и нормативная документация для его производства СТО 78805029-035-2015. Продукт (спортивный) может быть реализован в жидком и сухом виде. Новизна технологического решения отражена в Патенте № 2538151 Российской Федерации.

Для питания молодых спортсменов так же разработана технология творожного продукта с использованием методов мембранной фильтрации, направленных на решение различных технологических задач по концентрированию молочных продуктов. Так как требовалось повысить в нормализованной молочной смеси концентрацию протеина, выбран метод ультрафильтрации. Данный процесс проводился на модуле TetraAlcross UC при следующих параметрах: температура (48 ± 2) °С; коэффициент концентрирования 3,2. Полученный концентрат (пермеат) использовался в качестве молочной основы, в которую вводились компоненты, регулирующие углеводный состав, сочетающие быстрые и медленные углеводы, а также специальная добавка – креатин, способствующая наращиванию мышечной массы. Заквашивание и сквашивание смеси компонентов проводилось ассоциацией культур *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* иммобилизованных в гель биополимеров. Творожный продукт вырабатывается без отделения сыворотки. Ему присвоено товароведное название «Биоогуртный творожок».

Технология всех продуктов для питания спортсменов, производимых по инновационным технологиям, апробирована на действующих молочных предприятиях. Исследования показали, что новые продукты отличаются повышенной биологической ценностью белков. Для её определения изучен аминокислотный состав белков продуктов и рассчитан их аминокислотный скор, результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Аминокислотный скор белков продуктов для спортивного питания

Table 3 – Amino-acid score of proteins in sport supplement

Незаменимые аминокислоты	Шкала ФАО/ВОЗ		Биопродукт		Биородукт «Спортивный»		Биоогуртный творожок	
	А	С	А	С	А	С	А	С
Изолейцин	40,0	100	66,75	166,9	63,64	159,00	51,70	129,25
Лейцин	70,0	100	94,01	134,3	119,48	171,00	104,00	148,57
Лизин	55,0	100	80,25	145,9	72,73	132,00	76,70	138,18
Метионин+цистин	35,0	100	133,50	380,0	55,32	158,00	56,90	162,50
Фенилаланин+тирозин	60,0	100	84,06	140,1	87,92	147,00	114,00	190,00
Треонин	40,0	100	61,00	152,5	49,87	125,00	52,10	130,25
Триптофан	10,0	100	67,80	135,6	87,01	174,00	13,00	130,00
Валин	50,0	100	11,06	111,6	11,17	112,00	57,10	114,00

Примечание: А – содержание незаменимых аминокислот, мг в 1 г белка, С – аминокислотный скор, % относительно справочной шкалы ФАО/ВОЗ

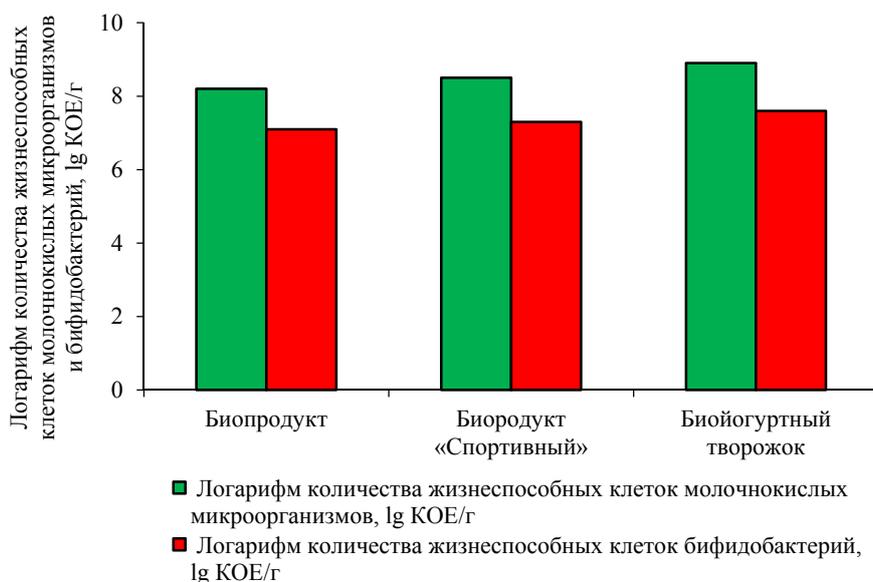


Рисунок 7 – Микробиологические показатели биопродуктов для питания спортсменов

Figure 7 – Microbiological marks of bioproducts for athletes

Отсутствие лимитирующей аминокислоты свидетельствует о биологической полноценности новых продуктов. Повышенное количество метионина в «Биопродукте» для спортивного питания следует объяснить введением в рецептуру гидролизата сывороточных белков, который богат этой незаменимой аминокислотой. Так же изучены микробиологические показатели новых продуктов, результаты представлены на рисунке 7.

Изучение микробиологических показателей и показателей безопасности позволяет отметить, что все новые продукты для питания спортсменов на завершающем этапе срока годности содержат не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г продукта жизнеспособных клеток пробиотических культур, в том числе не менее $1 \cdot 10^7$ КОЕ/г продукта бифидобактерий, что позволяет в соответствии с ГОСТ Р 52349-2005 (изм. № 1), считать данные продукты функциональными.

Выводы

На основании результатов аналитико-экспериментальных исследований определены закономерности процесса иммобилизации ассоциаций пробиотических культур, иммобилизованных в гели различных биополимеров:

– *L. acidophilus*, *B. lactis*, *S. thermophilus* иммобилизованные в гель желатина, пектина и крахмала в соотношении 5:1:1;

– *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* иммобилизованные в гель пектина и желатина в соотношении 2:1;

– *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* иммобилизованные в гель желатина, пектина и каррагинана в соотношении 1:1:1.

Экспериментально установлена эффективность их использования в инновационных биотехнологиях продуктов на молочной основе, предназначенных для специализированного питания, в частности питания спортсменов.

Список литературы

1. Гаврилова, Н. Б. Научные и практические основы биотехнологии молочных и молкосодержащих продуктов с использованием иммобилизации клеток микроорганизмов: монография / Н. Б. Гаврилова, О. А. Гладилова, Н. Л. Чернопольская. – Омск : Изд-во «Вариант–Омск», 2011. – 184 с.
2. Гаврилова, Н. Б. Специализированный продукт для спортивного питания / Н. Б. Гаврилова, Е. И. Петрова, Н. Л. Чернопольская // Пищевая промышленность. – 2013. – № 10. – С. 84–85.
3. Ганина, В. И. Повышение жизнеспособности клеток пробиотических бактерий в процессе сублимационного высушивания / В. И. Ганина, М. М. Сониева, А. Н. Соловьёва // Биотехнология. Вода и пищевые продукты: материалы международной конференции. – Москва, 2008. – 77 с.
4. Глобальные технологические тренды. Трендлер № 15, 2015. Режим доступа: <https://issek.hse.ru/trendletter>. – Дата доступа: 15.06.2017.
5. Хоулт, Дж. Краткий определитель бактерий Берджи в 2-х томах. Москва: Изд-во «Мир», 1997. – 800 с.
6. Крякунова, Е. В. Иммобилизация микроорганизмов и ферментов / Е. В. Крякунова, А. В. Канарский // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15, № 17. – С. 189–194. Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/immobilizatsiya-mikroorganizmov-i-fermentov>. – Дата доступа: 15.06.2017.
7. Хавкин, А. И. Микрофлора и развитие иммунной системы / А. И. Хавкин // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – 11, № 5. – С. 86–89. DOI: <https://doi.org/10.15690/vsp.v11i5.433>.

8. Aslim, B. The effect of immobilization on some probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* strains / B. Aslim, G. Alp // *Annals of Microbiology*. – 2009. – Vol. 59, № 1. – P. 127–132. <https://doi.org/10.1007/BF03175609>.
9. Bannikova, A. Preservation of oleic acid entrapped in a condensed matrix of high-methoxy pectin with glucose syrup / A. Bannikova, V. D. Paramita, S. Kasapis // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – Vol. 53. – P. 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.011>.
10. β -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices / U. Beshay, H. El-Enshasy, I. M. K. Ismail [et al.] // *Polish Journal of Microbiology*. – 2011. – Vol. 60, № 2. – P. 133–138. Режим доступа: <http://www.pjm.microbiology.pl/full/vol6022011.pdf>. – Дата доступа: 15.06.2017.
11. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications / J. Burgain, C. Gaiani, M. Linder, [et al.] // *Journal of Food Engineering*. – 2011. – Vol. 104, № 4. – P. 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.
12. Encapsulation: an alternative for application of probiotic microorganisms in thermally processed foods / C. P. Cavaleiro, M. de A. Etchepare, M. F. Silveira [et al.] // *Journal of the Center for Natural and Exact Sciences*. – 2015. – Vol. 37. – P. 65–74. <https://doi.org/10.5902/2179-460X19717>.
13. Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology / A. Das, S. Ray, U. Raychaudhuri [et al.] // *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 47–53. <https://doi.org/10.5958/j.2230-732X.7.1.007>.
14. Gauri, A. Immobilization and microencapsulation / A. Gauri, M. Shiwangi // *Journal of Advanced Research in Biotechnology*. – 2017. – Vol. 2, № 3. – P. 1–4. <http://dx.doi.org/10.15226/2475-4714/2/3/00129>.
15. Kinetic analysis and effect of culture medium and coating materials during free and immobilized cell cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb 12 / H. Jalili, H. Razavi, M. Safari [et al.] // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 13, № 3. – P. 1–10. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue3-fulltext-4>.
16. Microencapsulation and Fermentation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium* BB-12 / Y. Maryam, J. Fooladi, M. A. K. Motlagh // *Applied Food Biotechnology*. – 2015. – Vol. 2, № 4. – P. 27–32. <https://doi.org/10.22037/afb.v2i4.7711>.
17. Viability kinetics of free and immobilized *bifidobacterium bifidum* in presence of food samples under gastrointestinal in vitro conditions / A. G. Mendoza-Madrigal, E. Duran-Paramo, G. Valencia del Toro // *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*. – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 159–168. Режим доступа: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62049878016.pdf>. – Дата доступа: 15.06.2017.
18. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production / G. Mitropoulou, V. Nedovic, A. Goya [et al.] // *Journal of Nutrition and Metabolism*. – 2013. – Vol. 2013. – 15 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/716861>.
19. New method for selection of hydrogen peroxide adapted bifidobacteria cells using continuous culture and immobilized cell technology / V. Mozzetti, F. Grattepanche, D. Moine [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2010. – Vol. 9, № 60. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-60>.
20. Ozyurt, V. H. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food / V. H. Ozyurt, S. Ötles // *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 413–424. <http://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.4.8>.

References

1. Gavrilova N.B., Gladilova O.A., and N.L. Chernopol'skaya. *Nauchnye i prakticheskie osnovy biotekhnologii molochnykh i molokosoderzhashchikh produktov s ispol'zovaniem immobilizatsii kletok mikroorganizmov: monografiya* [Scientific and Practical Bases for the Biotechnology of Milk and Dairy Products by Immobilization of Cells: Monograph]. Omsk: Option–Omsk Publ., 2011, 184 p. (In Russ.).
2. Gavrilova N.B., Petrova E.I., and Chernopolskaya N.L. Specialized Product for Sports Nutrition. *Food Industry Publ.*, 2013, no. 10, pp. 84–85. (In Russ.).
3. Ganina, V.I., Sonieva M.M., and Solovyova A.N. Povyshenie zhiznesposobnosti kletok probioticheskikh bakteriy v protsesse sublimatsionnogo vysushivani [Raising the Viability of Probiotic Cells during Sublimation]. *Materialy mezhdunarodnoy konferentsii «Biotekhnologiya. Voda i pishchevye produkty»* [Conference Proceedings “Biotechnology. Water and Food Products”]. Moscow, 2008, 77 p. (In Russ.).
4. *Global'nye tekhnologicheskie trendy*. Trendler № 15, 2015 [Global Trends in Technology. Trendler № 15, 2015]. Available at: <https://issek.hse.ru/trendletter>. (accessed 15 June 2017).
5. Holt, J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology in 2 Vol.* Moscow: Mir Publ., 1997, 800 p. (In Russ.).
6. Kryakunova E.V. and Kanarsii A.V. *Immobilizatsiya mikroorganizmov i fermentov* [Immobilization of microorganisms and ferments]. *Herald of Kazan Technological University*, 2012, vol. 15, no. 17, pp. 189–194. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/immobilizatsiya-mikroorganizmov-i-fermentov>. (accessed 15 June 2017).
7. Khavkin A.I. Microflora and the development of the immune system. *Current pediatrics*, 2012, vol. 11, no. 5, pp. 86 – 89. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.15690/vsp.v11i5.433>.
8. Aslim B. and Alp G. The effect of immobilization on some probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* strains. *Annals of Microbiology*, 2009, vol. 59, no. 1, pp. 127–132. <https://doi.org/10.1007/BF03175609>.
9. Bannikova A., Paramita V.D., and Kasapis S. Preservation of oleic acid entrapped in a condensed matrix of high-methoxy pectin with glucose syrup. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 53, pp. 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.011>.

10. Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I.M.K. et al. β -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices. *Polish Journal of Microbiology*, 2011, vol. 60, no. 2, pp. 133–138. Available at: <http://www.pjm.microbiology.pl/full/vol6022011.pdf>. (accessed 15 June 2017).
11. Burgain J., Gaiani C., Linder M., et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 2011, vol. 104, no. 4, pp. 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.
12. Cavalheiro C.P., Etchepare M. de A., Silveira M.F., et al. Encapsulation: an alternative for application of probiotic microorganisms in thermally processed foods. *Journal of the Center for Natural and Exact Sciences*, 2015, vol. 37, pp. 65–74. <https://doi.org/10.5902/2179-460X19717>.
13. Das A., Ray S., Raychaudhuri U., et al. Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 2014, vol. 7, no. 1, pp. 47–53. <https://doi.org/10.5958/j.2230-732X.7.1.007>.
14. Gauri A. and Shiwangi M. Immobilization and microencapsulation. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 1–4. <http://dx.doi.org/10.15226/2475-4714/2/3/00129>.
15. Jalili H., Razavi H., Safari M., et al. Kinetic analysis and effect of culture medium and coating materials during free and immobilized cell cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb 12. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, vol. 13, no. 3, pp. 1–10. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue3-fulltext-4>.
16. Maryam Y., Fooladi J., and Motlagh M.A.K. Microencapsulation and Fermentation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium* BB-12. *Applied Food Biotechnology*, 2015, vol. 2, no. 4, pp. 27–32. <https://doi.org/10.22037/afb.v2i4.7711>.
17. Mendoza-Madrigal A.G., Duran-Paramo E., and Valencia del Toro G. Viability kinetics of free and immobilized *bifidobacterium bifidum* in presence of food samples under gastroin-testinal in vitro conditions. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 2017, vol. 16, no. 1, pp. 159–168. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62049878016.pdf>. (accessed 15 June 2017).
18. Mitropoulou G., Nedovic V., Goya A., et al. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013, vol. 2013, 15 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/716861>.
19. Mozzetti V., Grattepanche F., Moine D., et al. New method for selection of hydrogen peroxide adapted *bifidobacteria* cells using continuous culture and immobilized cell technology. *Microbial Cell Factories*, 2010, vol. 9, no. 60. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-60>.
20. Ozyurt V.H. and Ötles S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 413–424. <http://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.4.8>.

Гаврилова Наталья Борисовна

д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры «Технологии и оборудование пищевых производств», ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», 644008, Россия, г. Омск, Институтская площадь, 1, тел.: +7 (3812) 65-11-46, e-mail: adm@omgau.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-8544-4214>

Natalia B. Gavrilova

Dr.Sci.(Eng.), Professor, Professor of the Technologies and Equipment of Food Production Department, Stolypin Omsk State Agrarian University, 1, Institutskaya square, Omsk, 644008, Russia, phone: +7 (3812) 65-11-46, e-mail: adm@omgau.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-8544-4214>

Чернопольская Наталья Леонидовна

канд. техн. наук, доцент кафедры «Технологии и оборудование пищевых производств», ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», 644008, Россия, г. Омск, Институтская площадь, 1, тел.: +7 (3812) 65-11-46, e-mail: adm@omgau.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-1359-9190>

Natalia L. Chernopolskaya

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Technologies and Equipment of Food Production Department, Stolypin Omsk State Agrarian University, 1, Institutskaya square, Omsk, 644008, Russia, phone: +7 (3812) 65-11-46, e-mail: adm@omgau.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-1359-9190>

Банникова Анна Владимировна

д-р техн. наук, доцент, доцент кафедры «Технологии продуктов питания», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Россия, г. Саратов, Театральная площадь, 1, тел.: +7 (8452) 23-32-92, e-mail: rector@sgau.ru
 <http://orcid.org/0000-0002-8299-7208>

Anna V. Bannikova

Dr.Sci.(Eng.), Associate Professor, Associate Professor of the Technology of Food Products Department, Vavilov Saratov State Agrarian University, 1, Teatralnaya Square, Saratov, 410012, Russia, phone: +7 (8452) 23-32-92, e-mail: rector@sgau.ru
 <http://orcid.org/0000-0002-8299-7208>

Евдокимов Иван Алексеевич

д-р техн. наук, профессор, заведующий базовой кафедрой прикладной биотехнологии, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», 355009, Россия, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1, тел.: +7 (8652) 95-68-08, e-mail: info@ncfu.ru
 <http://orcid.org/0000-0002-5396-1548>

Ivan A. Evdokimov

Dr.Sci.(Eng.), Professor, Head of the Department of Applied Biotechnology, North-Caucasian Federal University, 1, Pushkina Str., Stavropol, 355009, Russia, phone: +7 (8652) 95-68-08, e-mail: info@ncfu.ru
 <http://orcid.org/0000-0002-5396-1548>

Шрамко Мария Ивановна

канд. биол. наук, заведующий международной научно-исследовательской лабораторией «Электро- и баромембранных технологий», ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», 355009, Россия, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1. тел.: +7 (8652) 95-68-08, e-mail: info@ncfu.ru

Maria I. Shramko

Cand.Sci.(Biol.), Head of the International Research Laboratory "Electro-and Baromembrane Technologies", North-Caucasian Federal University, 1, Pushkina Str., Stavropol, 355009, Russia, phone: +7 (8652) 95-68-08, e-mail: info@ncfu.ru

