

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092347** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2021.02.17**

(51) Int. Cl. *A61K 9/50* (2006.01)  
*A61K 35/745* (2015.01)  
*A61K 35/747* (2015.01)  
*A23P 10/30* (2016.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.04.20**

(54) **ВЛАГОСТОЙКАЯ ГРАНУЛА ПРОБИОТИКА И СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **62/660,388**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.04.20**

**Пенхаси Адель, Балуашвили Израэль  
(IL)**

(33) **US**

(86) **PCT/IL2019/050454**

(74) Представитель:

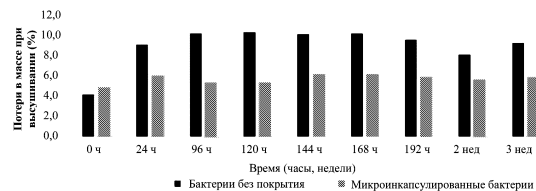
(87) **WO 2019/202604 2019.10.24**

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(71) Заявитель:

**ПОЛИКАПС ХОЛДИНГЗ ЛТД. (IL)**

(57) Предложена пробиотическая микрокапсула, содержащая сердцевину, содержащую пробиотические микроорганизмы; и слой покрытия, содержащий гибридную твердую дисперсию, содержащую съедобную жирную молекулу, равномерно диспергированную в водорастворимом пленкообразующем полимере, и съедобный медиатор, где указанный съедобный медиатор представляет собой октенилсукцинат крахмала.



202092347

A1

A1

202092347

PCT/IL2019/050454

МПК: *A61K 9/50* (2006.01) *A61K 35/747* (2015.01)*A61K 35/745* (2015.01) *A23P 10/30* (2016.01)

## **ВЛАГОСТОЙКАЯ ГРАНУЛА ПРОБИОТИКА И СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Данное изобретение относится к покрытиям гранул пробиотиков и, более конкретно, гранул пробиотиков, предназначенных для смешивания с продуктами питания с относительно высоким уровнем водной активности.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Защита питательных и биологически активных добавок в лекарственных формах от влаги в окружающей среде имеет важное значение, когда присутствие воды оказывает негативное влияние на действующее вещество. Отрицательное влияние влаги может возникнуть в ходе обычных производственных процессов, таких как процессы, включающие влажное гранулирование и/или нанесение покрытия. В альтернативном варианте влага может повредить действующее вещество во время хранения и отрицательно повлиять на срок годности конечного продукта.

Что касается пробиотиков, влага является особенно важным фактором стабильности и срока хранения многих пробиотических бактерий. Во многих случаях воздействие определенного уровня влажности на такие пробиотики может привести к дезактивации бактерий. В результате ассортимент продуктов питания, особенно продуктов с высоким уровнем водной активности, в которые могут быть включены такие бактерии, будет ограничен, а срок хранения значительно сократится.

Общие подходы, направленные на ограничение повреждения действующего вещества, включают упаковку лекарственных форм, содержащих чувствительное к влаге действующее вещество, в различные упаковочные элементы, такие как микрокапсулы, таблетки, капсулы и т.п. Однако, особенно в местах с очень влажным климатом, специальная упаковка не обеспечивает полной защиты от влаги, поскольку влага попадает внутрь вышеупомянутой упаковки. Другой способ предотвратить или уменьшить повреждение, которое может быть вызвано влагой, и уменьшить потребность в специальной упаковке - это покрытие твердых лекарственных форм материалами, которые обладают влагонепроницаемыми свойствами.

Такие материалы имеют по существу низкую проницаемость для водяного пара (WVP) или низкую скорость пропускания водяного пара (WVTR). Такие покрытия обычно

не влияют на основные свойства лекарственных форм, такие как распадаемость и профиль высвобождения действующего вещества. Примеры чувствительных к влаге лекарств включают аторвастатин, ранитидин, темазепам, большинство витаминов, различные лекарственные растения, ненасыщенные жирные кислоты и пробиотические бактерии. Повреждение, которое может возникнуть из-за влаги, может включать, например, распад действующего вещества в результате гидролиза, разрушение пробиотических бактерий или значительное снижение значения КОЕ (колониеобразующих единиц), изменения внешнего вида лекарственной формы при хранении, изменения распадаемости и/или времени растворения лекарственной формы. Таким образом, для защиты лекарственной формы от таких повреждений наносят влагонепроницаемые покрытия.

Для получения влагонепроницаемого покрытия обычно применяют гидрофобный нерастворимый в воде полимер. Полимеры, обычно используемые для этой цели, представляют собой поливинилацетат, зеин, шеллак, фталат ацетата целлюлозы (CAP), EUDRAGIT® E 100, который представляет собой катионный сополимер на основе диметиламиноэтилметакрилата, бутилметакрилата и метилметакрилата в соотношении 2:1:1, этилцеллюлозу (EC) и тому подобное. Однако такие полимеры продлевают распад лекарственной формы в организме после введения и, таким образом, задерживают высвобождение действующих веществ или пробиотических бактерий. Аналогично, покрытие из этих полимеров требует использования органического растворителя, что нежелательно, поскольку такой процесс требует дополнительных затрат, связанных с оборудованием для кондиционирования воздуха, средствами защиты от взрыва и тому подобных, для безопасного обращения с такими материалами. Еще один способ получения влагонепроницаемого покрытия - это сочетание водорастворимого полимера с липофильными веществами. Частицы гидрофобных или липофильных веществ будут заключены в водорастворимую пленку после нанесения покрытия или образования пленки. Хотя присутствие частиц липофильного вещества в пленке может уменьшить пропускание водяного пара, они не могут покрывать всю площадь пленки, и, таким образом, водяной пар все еще может легко проникать через промежутки между частицами.

Пробиотики в целом - это микроорганизмы, чувствительные к влаге, и есть определенные штаммы, которые более уязвимы, чем другие.

BB-12, определенный штамм *Bifidobacterium lactis*, который культивируется компанией Chris Hansen, и LGG (определенный штамм *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), который культивируется компанией Chris Hansen), считаются очень чувствительными к

влаге и особенно к среде с высокой водной активностью ( $a_w$ ). В результате выживаемость этих бактерий значительно снижается за очень короткое время, когда их объединяют с продуктами питания с относительно высоким уровнем активности воды.

Бифидобактерии представляют собой анаэробные палочковидные грамположительные бактерии, которые обычно населяют толстую кишку человека, младенца и взрослого (Simon GL and Gorbach SL. *Intestinal flora in health and disease. Gastroenterol*, 1984; 86: 174-193). Сообщалось о положительных эффектах бифидобактерий, включая улучшение кишечной флоры за счет предотвращения колонизации патогенами, активации иммунной системы, улучшенного переваривания белков и уменьшения диареи или запора (Ishibashi N and Shimamura S. *Bifidobacteria: Research and development in Japan. Food Technol*, 1993; 6: 126-136). Бифидобактерии употребляли в составе ферментированных пищевых продуктов на протяжении десятилетий, и современные коммерческие штаммы включают штаммы *Bifidobacterium animalis* (*B. animalis*) ssp. *lactis* Bf-6, *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) BB-12, *B. lactis* DR10 (HN019), *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) BB536, *B. breve* Yakult, *B. breve* SBT-2928 и *B. breve* C50. В США различные виды *Bifidobacterium* в целом признаны безопасными (GRAS) для применения в обычных пищевых продуктах и смесях для младенцев, включая: *B. animalis* ssp. *lactis* Bf-6 для применения в отдельных продуктах питания (GRN 377;  $10^{11}$  КОЕ/порцию обычных продуктов питания); *B. lactis* Bb-12 для применения в питательных смесях для детей в возрасте четырех месяцев и старше (GRN 49;  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/г детской смеси) и *B. longum* BB536 для применения в отдельных продуктах и питательных смесях для детей (GRN 268;  $10^{10}$  КОЕ/порцию обычных продуктов питания;  $10^{10}$  КОЕ/г смеси для доношенных детей). Известно, что минимальный уровень жизнеспособных бифидобактерий в коммерческих молочных продуктах для оказания положительного воздействия на здоровье человека составляет примерно  $10^5 \sim 10^7$  КОЕ/мл (Cui JH, Shim JM, Lee JS, et al. *Gastric acid resistance of Lactobacilli and Bifidobacteria in commercial drink and lipid yogurts. Kor J Microbiol*, 2000; 36: 161-165). В последнее время наблюдается рост мотивации к применению бифидобактерий в детском питании, особенно в сухих детских смесях (PIF) (Duncker, 2013). Это в основном предназначено для поддержания полезной микрофлоры у младенцев, особенно после лечения антибиотиками, которые повреждают естественную микрофлору (Morinaga Milk Industry Co. Ltd. *Bifidobacteria & Health. Japan: August 1997*, pp. 4).

*Bifidobacterium breve* M-16V (*B. breve*) представляет собой Y-образную грамположительную анаэробную бактерию. Этот организм депонирован в Бельгийских

координированных коллекциях микроорганизмов (ВССМ) и обозначен как LMG 23729. *B. breve* обнаружили в стуле у младенцев и взрослых. *B. breve* M-16V впервые выпустили в продажу в Японии в 1976 году. Исходная замороженная культура *B. breve* M-16V строго контролируется для обеспечения чистоты и стабильности штамма. Технические характеристики продукта подтверждают, что *B. breve* M-16V подходит для применения в продуктах питания, включая детскую смесь для доношенных детей, детскую смесь для недоношенных детей и лечебное питание. Готовые продукты, изготовленные из культур *B. breve* M-16V, воспроизводимо соответствуют стандартам состава и соответствуют ограничениям на загрязняющие вещества, применяющимся к пищевым ингредиентам. *B. breve* M-16V соответствует стандартам безопасности, перечисленным в рекомендациях Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН/ВОЗ для оценки микроорганизмов для пробиотического применения в продуктах питания. Результаты показывают, что *B. breve* M-16V не является токсичным или патогенным и поэтому безопасен для применения в продуктах питания.

*Bifidobacterium animalis* подвид *Lactis* (также известный как ВВ-12) будет обозначаться в данном документе «*Bifidobacterium*», и он представляет собой каталазонегативную палочковидную бактерию. Он был депонирован в банке культур клеток компанией Chr. Hansen в 1983 году. На момент выделения считалось, что *Bifidobacterium* относится к видам *Bifidobacterium bifidum*. Современные методы молекулярной классификации переклассифицировали ВВ-12 как *Bifidobacterium animalis*, а затем как новый вид *Bifidobacterium lactis*. Позже было показано, что вид *B. lactis* не соответствует критериям, применяемым к виду, и его включили как подвид в *Bifidobacterium animalis*. Таким образом, на сегодняшний день ВВ-12 классифицируется как *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*. Несмотря на изменение названия с годами, штамм ВВ-12 не изменился.

*Bifidobacterium* происходит из коллекции молочных культур компании Chr. Hansen. Это штамм, специально отобранный компанией Chr. Hansen для производства пробиотических молочных продуктов. *Bifidobacterium* применяют во всем мире в детских смесях, пищевых добавках и кисломолочных продуктах. Этот штамм хорошо подходит для промышленности, проявляет ферментационную активность, высокую аэротолерантность, хорошую стабильность и высокую устойчивость к кислотам и желчи, также в виде лиофилизированных продуктов в пищевых добавках. Кроме того, *Bifidobacterium* не портит вкус, внешний вид или восприятие еды во рту и может сохранять жизнеспособность в пробиотических продуктах до употребления.

Компания Chr. Hansen является исключительным производителем *Bifidobacterium*, который является одним из самых важных и наиболее широко изученных штаммов пробиотических бактерий за все время. В настоящее время данный штамм применяют в различных пищевых добавках и пищевых продуктах, таких как детские смеси и кисломолочные продукты.

*Lactobacillus rhamnosus* представляет собой короткую грамположительную гетероферментативную факультативную анаэробную неспорообразующую палочку, которая часто встречается в виде цепочек. Хотя *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) способна выживать в кислоте и желчи желудка и кишечника, считается, что она колонизирует пищеварительный тракт и балансирует микрофлору кишечника, данные свидетельствуют о том, что *Lactobacillus rhamnosus*, вероятно, является временным обитателем, а не аборигенным. Тем не менее, он считается пробиотиком, полезным для лечения различных заболеваний, поскольку он действует на многих уровнях. *Lactobacillus rhamnosus* GG связывается со слизистой оболочкой кишечника.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Данное изобретение станет полностью понятным из подробного описания, приведенного ниже, и сопровождающих графических материалов, которые приведены только в качестве иллюстрации и примеров и не предназначены для ограничения объема изобретения.

На Фиг. 1 изображен график, демонстрирующий содержание воды в микроинкапсулированных бактериях в сравнении с бактериями без нанесенного покрытия, которые хранились в одинаковых условиях при непрерывном исследовании стабильности, а также исследовании потери в массе при высушивании (LOD) с течением времени.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям предложена пробиотическая микрокапсула, содержащая: сердцевину, содержащую пробиотические микроорганизмы; и слой покрытия, содержащий гибридную твердую дисперсию, содержащую съедобную жировую молекулу, равномерно распределенную в водорастворимом пленкообразующем полимере, и съедобный медиатор, где указанный съедобный медиатор представляет собой октенилсукцинат крахмала.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям водорастворимый пленкообразующий полимер может представлять собой гидроксипропилкрахмал.

Согласно некоторым воплощениям пробиотические микроорганизмы могут включать *Bifidobacterium*.

Согласно некоторым воплощениям съедобная жировая молекула может быть выбрана из группы, включающей лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитат, пальмитолеат, гидроксипальмитат, арахидиновую кислоту, олеиновую кислоту, стеариновую кислоту, стеарат натрия, стеарат кальция, стеарат магния, гидроксидоктакозанила гидроксистеарат, длинноцепочечные сложные эфиры олеиновой кислоты, сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, эстерифицированные жирные диолы, гидроксильированные жирные кислоты, гидрогенизированные жирные кислоты (насыщенные или частично насыщенные жирные кислоты), частично гидрогенизированное соевое масло, частично гидрогенизированное хлопковое масло, алифатические спирты, фосфолипиды, лецитин, фосфатидилхолин, триэфиры жирных кислот, кокосовое масло, гидрогенизированное кокосовое масло, масло какао; пальмовое масло; эвтектические смеси жирных кислот; моно- и диглицериды, полуксамеры, блок-сополимеры полиэтиленгликоля и сложные полиэфиры или их комбинацию.

Согласно некоторым предпочтительным воплощениям съедобная жировая молекула может представлять собой масло какао и/или стеариновую кислоту.

Согласно некоторым воплощениям гибридная твердая дисперсия может представлять собой единую гибридную твердую дисперсию.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям предложена пробиотическая микрокапсула (также обозначаемая в данном документе гранулой), содержащая сердцевину, содержащую пробиотики и по меньшей мере один слой покрытия, защищающий пробиотик от влаги.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям гранула может быть включена в продукт питания, в основном жидкие продукты питания, включая, например, продукты питания на водной основе, жидкие смеси для младенцев, йогурт, молочные продукты, нектары, фруктовые соки и тому подобное.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям микрокапсула может быть предпочтительно заключена в продукт питания с относительно высоким уровнем водной активности.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям пробиотики могут включать любые подходящие живые микроорганизмы, предназначенные для обеспечения пользы

для здоровья при употреблении, обычно за счет улучшения или восстановления кишечной флоры, например, рода, выбранного из *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*.

Согласно некоторым воплощениям пробиотики предпочтительно представляют собой бактерии *Bifidobacterium* и/или LGG.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям по меньшей мере одно покрытие может включать специальное покрытие из герметизирующей пленки, содержащее гибридную твердую дисперсию, в которой съедобная жировая молекула равномерно распределена в водорастворимом пленкообразующем полимере с использованием, например, съедобного медиатора.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям жировая молекула может включать любую подходящую съедобную жирную кислоту, включая, например, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитат, пальмитолеат, гидроксипальмитат, арахидиновую кислоту, олеиновую кислоту, стеариновую кислоту, стеарат натрия, стеарат кальция, стеарат магния, гидроксиктокозанила гидроксистеарат, длинноцепочечные сложные эфиры олеиновой кислоты, сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, эстерифицированные жирные диолы, гидроксированные жирные кислоты, гидрогенизированные жирные кислоты (насыщенные или частично насыщенные жирные кислоты), частично гидрогенизированное соевое масло, частично гидрогенизированное хлопковое масло, алифатические спирты, фосфолипиды, лецитин, фосфатидилхолин, триэфиры жирных кислот, кокосовое масло, гидрогенизированное кокосовое масло, масло какао; пальмовое масло; эвтектические смеси жирных кислот; моно- и диглицериды, поллоксамеры, блок-сополимеры полиэтиленгликоля и сложные полиэфиры или их комбинацию.

Согласно некоторым воплощениям жировая молекула предпочтительно представляет собой масло какао и/или стеариновую кислоту.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям водорастворимый пленкообразующий полимер может включать, например, одно или более чем одно из: гидроксипропилкрахмала (HPS), поли-N-замещенного производного акриламида, полипропиленоксида, поливинилметилового эфира, частично ацетилизованного продукта поливинилового спирта, метилцеллюлозы (MC), гидроксипропилцеллюлозы (HPC), метилгидроксиэтилцеллюлозы (MHEC), гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксипропилэтилцеллюлозы (HPEC), гидроксиметилпропилцеллюлозы (HMPC), этилгидроксиэтилцеллюлозы (EHEC) (этулозы), гидроксипропилметилцеллюлозы (HEMC), гидроксиметилэтилцеллюлозы (HMEC), пропилгидроксиэтилцеллюлозы (PHEC),



гидрофобно модифицированной гидроксиэтилцеллюлозы (NEXTON), амилозы, амилопектина, поли(органофосфазенов), ксилоглюкана, синтетических белков-производных эластина и любого из вышеуказанных полимеров, дополнительно замещенных гидрофильным или гидрофобным мономером.

Согласно некоторым воплощениям поли-N-замещенное производное акриламида может включать одно или более чем одно из: поли(N-изопропилакриламида) (PNIPAM), поли-N-акрилоилпиперидина, поли(N,N-диэтилакриламида) (PDEAAm), поли(N-винилкапролактама) (PVCL), поли[2- (диметиламино)этилметакрилата] (PDMAEMA), поли(этиленгликоля) (PEG), поли(этиленоксида) (PEO), метакрилатных полимеров PEG (PEGMA), поли-N-пропилметакриламида, поли-N-изопропилакриламида, поли-N-диэтилакриламида, поли-N-изопропилметакриламида, поли-N-циклопропилакриламида, поли-N-акрилоилпирролидина, поли-N,N-этилметилакриламида, поли-N-циклопропилметакриламида, поли-N-этилакриламида, поли-N-замещенных производных метакриламида, сополимеров, содержащих N-замещенное производное акриламида и N-замещенное производное метакриламида, и сополимер N-изопропилакриламида и акриловой кислоты.

В некоторых иллюстративных воплощениях гидрофильный мономер может включать одно или более чем одно из: N-винилпирролидона, винилпиридина, акриламида, метакриламида, N-метилакриламида, гидроксиэтилметакрилата, гидроксиметилакрилата, гидроксиэтилакрилата, гидроксиметилметакрилата, метакриловой кислоты и акриловой кислоты, имеющих кислую группировку, а также солей этих кислот, винилсульфоновой кислоты, стиролсульфоновой кислоты, производных, имеющих основную группировку, таких как N,N-диметиламиноэтилметакрилат, N,N-диэтиламиноэтилметакрилат, N,N-диметиламинопропилакриламид, и солей этих производных.

В некоторых иллюстративных воплощениях гидрофобный мономер может включать одно или более чем одно из: этилакрилата, метилметакрилата и глицидилметакрилата; N-замещенных производных алкметакриламида, таких как N-н-бутилметакриламид; винилхлорид, акрилонитрил, стирол, винилацетат.

Согласно некоторым воплощениям водорастворимый пленкообразующий полимер представляет собой HPS и/или HPC.

Согласно некоторым воплощениям съедобный медиатор может включать, например, октенилсукцинат крахмала (SOS).

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям съедобный медиатор может снижать межфазное натяжение между водорастворимым пленкообразующим полимером и

съедобной жировой молекулой. Согласно некоторым воплощениям снижение поверхностного натяжения может создать тесную связь между водорастворимым пленкообразующим полимером и съедобной жировой молекулой, например, обеспечивая образование однородного, твердого и целостного пленочного покрытия, окружающего сердцевину микрокапсул.

Согласно некоторым воплощениям октенилсукцинат крахмала содержит по меньшей мере две части, которые обеспечивают неожиданное сцепление гидрофильного компонента и гидрофобного компонента. В частности, октенилсукцинат крахмала в некоторых воплощениях может включать гидрофильную часть, которая может прилипнуть к водорастворимому пленкообразующему полимеру, и по меньшей мере одну гидрофобную часть, которая прилипает к съедобной жировой молекуле.

Согласно некоторым воплощениям эти уникальные свойства октенилсукцината крахмала позволяют создавать единую гибридную твердую дисперсию, которая действует как барьер для влаги, предотвращая проникновение влаги в сердцевину указанной микрокапсулы.

Согласно некоторым воплощениям гибридная твердая дисперсия обеспечивает по существу однородное покрытие, которое не дает воде проникнуть в сердцевину.

Согласно некоторым воплощениям единая гибридная твердая дисперсия может обеспечивать превосходящие свойства, например, по сравнению с отдельным защитным слоем, например, отдельные слои могут иметь более высокую способность пропускать влагу, например, во время наслоения и/или из-за неомогенного покрытия каждого слоя.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям пробиотики могут присутствовать в количестве, варьирующем от 10 до 60% масс./масс. от массы микрокапсулы.

Согласно некоторым воплощениям данного изобретения сердцевина может дополнительно содержать наполнитель. Примеры наполнителей включают микрокристаллическую целлюлозу, сахар, такой как лактоза, глюкоза, галактоза, фруктоза или сахароза; дикальция фосфат; сахарные спирты, такие как сорбит, маннит, лактит, ксилит, изомальт, эритрит и гидролизаты гидрогенизированного крахмала; кукурузный крахмал; картофельный крахмал; карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы или их смесь, но не ограничиваются перечисленным. В предпочтительном воплощении наполнитель представляет собой лактозу.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям наполнитель может присутствовать в количестве, варьирующем от 60 до 70% масс./масс. от массы микрокапсулы.

Согласно некоторым воплощениям настоящего изобретения сердцевина может дополнительно содержать связывающее вещество.

Примеры связывающих веществ включают в качестве примера, не являющегося исчерпывающим, повидон (ПВП: поливинилпирролидон), коповидон (сополимер винилпирролидона и винилацетата), поливиниловый спирт, низкомолекулярную гидроксипропилметилцеллюлозу (НПМС), низкомолекулярную гидроксипропилцеллюлозу (НРС), низкомолекулярную гидроксиметилцеллюлозу (МС), низкомолекулярную карбоксиметилцеллюлозу натрия, низкомолекулярную гидроксипропилцеллюлозу, низкомолекулярную гидроксиметилцеллюлозу, ацетат целлюлозы, желатин, гидролизованный желатин, полиэтиленоксид, гуммиарабик, декстрин, мальтодекстрин, крахмал и водорастворимые полиакрилаты и полиметакрилаты, низкомолекулярную этилцеллюлозу или их смесь. В предпочтительном воплощении связывающим веществом является мальтодекстрин.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям связывающее вещество может присутствовать в количестве, варьирующем от 10 до 15% масс./масс. от массы микрокапсулы.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям микрокапсула может быть включена в продукт питания, обладающий высокой водной активностью, например, без вреда для пробиотиков, содержащихся в микрокапсуле.

Водная активность, или  $a_w$  - это парциальное давление пара воды в веществе, деленное на парциальное давление пара воды в стандартном состоянии. В области пищевой науки стандартное состояние чаще всего определяется как парциальное давление пара чистой воды при той же температуре. Чистая дистиллированная вода имеет водную активность, равную единице.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям в данном документе предложен состав для микроинкапсулирования, который обеспечивает чувствительные пробиотические бактерии превосходной защитой от влажности, препятствуя их дезактивации и, таким образом, продлевая срок хранения. Это, в свою очередь, может продлить срок хранения продуктов, в которых будут присутствовать бактерии, даже при высоких температурах.

Это предварительное исследование является убедительным доказательством концепции такого микроинкапсулирования, предназначенного для защиты чувствительных пробиотических бактерий в среде с относительно высокой влажностью при комнатной температуре. Возможность использования этой технологии была доказана при выдерживании микроинкапсулированных пробиотических бактерий на воздухе при комнатной температуре в течение длительного времени и определении содержания воды с использованием метода LOD. Точно так же было обнаружено, что процесс микроинкапсулирования полностью безопасен, поскольку количество бактерий сохранялось на исходном уровне.

Согласно некоторым иллюстративным воплощениям в настоящем документе предложен способ получения микрокапсулы для защиты пробиотиков от влаги, включающий:

Приготовление сердцевины микрокапсулы, содержащей *Bifidobacterium*;

Покрытие сердцевины по меньшей мере одним покрытием, имеющим низкие значения скорости пропускания водяного пара (WVTR); где по меньшей мере одно покрытие содержит гидроксипропилкрахмал (HPS), масло какао (CB) и октенилсукцинат крахмала.

Согласно некоторым воплощениям способ может включать приготовление 5% масс./масс. раствора HPS путем добавления HPS к нагретой дистиллированной воде (85-90°C);

Добавление октенилсукцината крахмала к нагретой дистиллированной воде и непрерывное перемешивание до получения однородного прозрачного раствора; и предварительное плавление масла какао при перемешивании с использованием механической мешалки.

Согласно некоторым воплощениям масло какао предварительно плавят при 50°C.

Согласно некоторым воплощениям полученный раствор октенилсукцината крахмала и расплавленное СВ гомогенизируют в 5% масс./масс. растворе HPS с использованием гомогенизатора.

*В) Способы:*

*1) Получение пленок: На основе гидроксипропилкрахмала (HPS) в качестве пленкообразующего полимера.*

Готовили различные составы пленок и характеризовали по скорости пропускания водяного пара (WVTR).

HPS, масло какао (CB) и октенилсукцинат крахмала (также имеющий коммерческое название Emfix) точно взвешивали для получения определенного соотношения HPS: CB: октенилсукцинат крахмала. В Таблице 2 представлены различные составы пленок с различным соотношением HPS: CB: октенилсукцинат крахмала, полученные в настоящем исследовании. Сначала к нагретой дистиллированной воде (85-90°C) добавляли необходимое количество HPS при перемешивании с использованием магнитной мешалки, чтобы получить 5% масс./масс. полимера. Перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора (15-30 мин при 85-90°C). Затем к нагретой дистиллированной воде добавляли необходимое количество октенилсукцината крахмала, перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора. Масло какао предварительно плавил при 50°C при перемешивании с использованием механической мешалки. Полученный раствор октенилсукцината крахмала и расплавленный CB затем гомогенизировали в 5% масс./масс. раствор HPS с использованием гомогенизатора в течение 90 секунд, скорость гомогенизатора составляла 3500 об/мин (гомогенизатор, HSIANG TAI MACHINERY INDUSTRY, модель: HG-300 максимальная скорость - 26000 об/мин). Последнюю дисперсию затем охлаждали до 32-36°C и перемешивали в течение дополнительных 20 минут, чтобы обеспечить полное растворение полимера.

#### ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### Пример 1. Воплощения композиций сердцевины и покрытия (формирование сердцевины на основе раствора)

Примеры сердцевины и покрытия приведены ниже в Таблице 1.

**Таблица 1.** Примеры сердцевины и покрытия

Название материала	Название продукта	Изготовитель	Применение	% масс./масс.
Bifidobacterium	Probio-Тес – смесь бифидобактерий – 100 V1	Ch. Hans.	бактерии	10 - 20
лактоза	Pharmatose 100M моногидрат лактозы, просеянный	DFE Pharma	наполнитель	61 - 67
мальтодекстрин	MALDEX G190 PHARMA	TEROSE SYRAL	связывающее вещество	12 - 13
гидроксипропилкрахмал (HPS)		-	покрытие	-
масло какао (CB)	масло какао	Lubeca Germany	покрытие	-
октенилсукцинат крахмала (SOS)		-	покрытие	-

## Пример 2. Способ микроинкапсулирования сердцевины, содержащей Bifidobacterium

В одном воплощении способ микроинкапсулирования является следующим.

### *А) Состав пленочного покрытия*

Чтобы найти правильный состав, обеспечивающий наивысшую барьерную способность, готовили различные комбинации компонентов покрытия и испытывали на скорость пропускания водяного пара (WVTR) в лабораториях Versaperm Ltd. (Maidenhead, UK).

### *Б) Получение микроинкапсулированных бифидобактерий*

Вначале приготавливали сердцевину, включавшую Bifidobacterium, с использованием необходимой композиции. Затем на полученную сердцевину наносили покрытие с использованием тех конкретных кроющих составов, которые имели самые низкие значения WVTR. Аналогично, процесс микроинкапсулирования был запланирован, чтобы выяснить, может ли конкретный кроющий состав также покрывать сердцевину в ходе процесса, помимо его способности образовывать свободную пленку, что было необходимо для выполнения теста WVTR. Результаты этой части эксперимента показали, что процесс нанесения покрытия может протекать очень гладко и быстро, при этом размер частиц и их распределение по размерам находятся в требуемом диапазоне. Значения LOD (потери в массе при высушивании) можно контролировать и регулировать в диапазоне, обеспечивающем долгосрочную стабильность бактерий.

### *В) Способы:*

*1) Получение пленок: На основе гидроксипропилкрахмала (HPS) в качестве пленкообразующего полимера.*

Готовили различные составы пленок и характеризовали по скорости пропускания водяного пара (WVTR).

HPS, масло какао (CB) и октенилсукцинат крахмала (также имеющий коммерческое название Emfix) точно взвешивали для получения определенного соотношения HPS: CB: октенилсукцинат крахмала. В Таблице 2 представлены различные составы пленок с различным соотношением HPS: CB: октенилсукцинат крахмала, полученные в настоящем исследовании. Сначала к нагретой дистиллированной воде (85-90°C) добавляли необходимое количество HPS при перемешивании с использованием магнитной мешалки, чтобы получить 5% масс./масс. полимер. Перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора (15-30 мин при 85-90°C). Затем к нагретой дистиллированной воде добавляли необходимое количество октенилсукцината крахмала, перемешивание продолжали до получения гомогенного

прозрачного раствора. Масло какао предварительно плавил при 50°C при перемешивании с использованием механической мешалки. Полученный раствор октенилсукцината крахмала и расплавленный СВ затем гомогенизировали в 5% масс./масс. растворе НРС с использованием гомогенизатора в течение 90 секунд, скорость гомогенизатора составляла 3500 об/мин (гомогенизатор, HSIANG TAI MACHINERY INDUSTRY, модель: HG-300 максимальная скорость - 26000 об/мин). Последнюю дисперсию затем охлаждали до 32-36°C и перемешивали в течение дополнительных 20 минут, чтобы обеспечить полное растворение полимера.

Наконец, дисперсию выливали в чашку Петри (диаметром 100 мм) и сушили при комнатной температуре в потоке воздуха в вытяжном шкафу в течение по меньшей мере 96 часов.

**Таблица 2.**

<b>Состав пленки</b>	<b>НРС: СВ: SOS % (масс./масс.)</b>		
	<b>НРС</b>	<b>СВ</b>	<b>SOS</b>
<b>100:0:0</b>	100	0	0
<b>70:0:30</b>	70	0	30
<b>60:0:40</b>	60	0	40
<b>80:10:10</b>	80	10	10
<b>70:15:15</b>	70	15	15
<b>70:10:20</b>	70	10	20
<b>70:20:10</b>	70	20	10
<b>65:25:10</b>	65	25	10
<b>60:30:10</b>	60	30	10
<b>50:40:10</b>	50	40	10
<b>50:30:20</b>	50	30	20
<b>50:25:25</b>	50	25	25
<b>50:20:30</b>	50	20	30

В Таблице 2 показаны некоторые воплощения различных составов пленок на основе различных соотношений НРС: СВ: октенилсукцинат крахмала.

2) *Получение пленки: На основе НРС (гидроксипропилцеллюлозы) в качестве пленкообразующего полимера.*

НРС, масло какао (СВ) и октенилсукцинат крахмала точно взвешивали для получения определенного соотношения НРС:СВ:октенилсукцинат крахмала. В Таблице 3

представлены различные составы пленок с различным соотношением НРС:СВ:октенилсукцинат крахмала, полученные в данном исследовании. Вначале к нагретой дистиллированной воде добавляли необходимое количество октенилсукцината крахмала, перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора. Масло какао предварительно плавил при 50°C при перемешивании с использованием механической мешалки. Затем полученную смесь гомогенизировали в 5% масс./масс. дисперсии НРС LF, которую готовили в предварительно нагретой дистиллированной воде при 75°C, как описано выше, с использованием гомогенизатора. Последнюю дисперсию затем охлаждали до уровня ниже НКТР (нижняя критическая температура растворения) полимера и перемешивали в течение дополнительных 30 минут, чтобы обеспечить полное растворение полимера. Наконец, дисперсию выливали в чашку Петри (диаметром 100 мм) и сушили при комнатной температуре в потоке воздуха в вытяжном шкафу в течение по меньшей мере 96 часов.

Таблица 3.

Состав пленки	НРС:СВ:СОС % (масс./масс.)		
	НРС	СВ	СОС
<b>100:0:0</b>	100	0	0
<b>70:15:15</b>	70	15	15
<b>70:10:20</b>	70	10	20
<b>70:20:10</b>	70	20	10
<b>70:5:25</b>	70	5	25
<b>60:20:20</b>	60	20	20
<b>50:40:10</b>	50	40	10
<b>50:30:20</b>	50	30	20
<b>50:25:25</b>	50	25	25
<b>50:20:30</b>	50	20	30

В Таблице 3 показаны некоторые воплощения различных составов пленок на основе различных соотношений НРС: СВ: Октенилсукцинат крахмала.

### 3) Испытания на скорость пропускания водяного пара (WVTR).

Данное испытание основано на измерении количества водяного пара, прошедшего через единицу площади образца исследуемой пленки за единицу времени при определенных условиях. Скорость пропускания водяного пара выражается в граммах на квадратный метр за 24 часа [г/(м<sup>2</sup>·24 ч)]. Для измерения WVTR различных пленок использовали цифровой измеритель WVTR Versaperm MkV (Versaperm Ltd., Maidenhead, UK) с площадью измерения 10 см<sup>2</sup>, оснащенный электролитическим детектирующим датчиком. Метод был основан на ISO 15106-3:2003.



Испытание 1. Испытание проводили при 40°C и 100% влажности в течение 24 часов.

Испытание 2. Испытание проводили при комнатной температуре (23-25°C) и 100% влажности в течение 24 часов.

4) *Приготовление пленок для процесса микроинкапсулирования без гибридной твердой дисперсии.*

HPS, масло какао (CB) и октенилсукцинат крахмала точно взвешивали для получения определенного соотношения HPS: CB: октенилсукцинат крахмала. В Таблице 4 представлены различные составы пленок с различным соотношением HPS: CB: октенилсукцинат крахмала, полученные в настоящем исследовании. Вначале к нагретой дистиллированной воде (85-90°C) добавляли необходимое количество HPS при перемешивании с использованием магнитной мешалки, чтобы получить 5% масс./масс. полимер. Перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора (15-30 мин при 85-90°C).

Затем к нагретой дистиллированной воде добавляли необходимое количество октенилсукцината крахмала, перемешивание продолжали до получения гомогенного прозрачного раствора. Масло какао предварительно плавил при 50°C при перемешивании с использованием механической мешалки. Полученный раствор октенилсукцината крахмала и расплавленный CB затем гомогенизировали в 5% масс./масс. растворе HPS с использованием гомогенизатора в течение 90 секунд, скорость гомогенизатора составляла 3500 об/мин (гомогенизатор Hsiang Tai Machinery Industry, модель: HG-300, максимальная скорость - 26000 об/мин). Полученную дисперсию затем охлаждали до 32-36°C и перемешивали в течение дополнительных 20 минут, чтобы обеспечить полное растворение полимера.

**Таблица 4.** Различные составы пленок на основе различных соотношений HPS: CB: октенилсукцинат крахмала.

Состав пленки	HPS: CB: SOS % (масс./масс.)		
	HPS	CB	октенилсукцинат крахмала
<b>55:35:10 T1</b>	55	35	10
<b>65:25:10 T1</b>	65	25	10
<b>55:35:10 T2</b>	55	35	10
<b>65:25:10 T2</b>	65	25	10

T1 - 20% масс./масс. бактерий от итоговой микрокапсулы. T2 - 10% масс./масс. бактерий от итоговой микрокапсулы.

### 5) Процесс приготовления микрокапсул

Процесс микроинкапсулирования начинался с создания сердцевин с последующим нанесением покрытия:

#### 1) Приготовление сердцевин

Сердцевину получали методом влажной грануляции. Водный раствор связывающего вещества (например, мальтодекстрина) распыляли на порошковую смесь, состоящую из бактерий и наполнителя, для консолидации частиц с образованием агломератов. Компоненты, используемые для приготовления микрокапсул, сведены в Таблицу 5.

**Таблица 5.** Композиция микрокапсул согласно одному воплощению данного изобретения

Название материала	Название продукта	Применение	% масс./масс. готовой микрокапсулы
<b>Bifidobacteria lactis (Bifidobacterium)</b>	Probio-Тес – смесь бифидобактерий – 100 V1	Бактерии	10 - 20
<b>Лактоза</b>	Pharmatose 100M Моногидрат лактозы (просеянный)	Наполнитель	61 - 67
<b>Мальтодекстрин</b>	MALDEX G190 PHARMA	Связывающее вещество	12 - 13
<b>Гидроксипропилкрахмал (HPS)</b>	EMDEN ESH 15	Покрытие	10 - 11
<b>Масло какао</b>	Масло какао	Покрытие	4 - 5
<b>Октенилсукцинат крахмала</b>	октенилсукцинат крахмала (Emfix X02, K02)	Покрытие	1,8

#### 2) Процесс нанесения покрытия

Нанесение покрытия осуществляли путем распыления раствора полимера непосредственно на сердцевину, полученную на предыдущей стадии.

И получение сердцевин, и нанесения покрытия осуществляли в Innojet Ventilus 2.5 (Romaco-Huttlin, Esteinen, Германия).

Толщину слоев выражали в % увеличения массы (WG), которое достигалось в процессе нанесения покрытия, по отношению к исходной массе субстрата перед процессом нанесения покрытия в соответствии со следующим уравнением:

$$\%WG = \frac{WG}{w_0} \times 100 = \frac{w_d - w_0}{w_0} \times 100$$

Где  $W_d$  и  $W_0$  - масса субстрата после и до процесса нанесения покрытия, соответственно, а WG - увеличение массы.

**Таблица 6.** Параметры, применяемые при грануляции бифидобактерий

<b>Параметры процесса нанесения покрытия</b>	<b>Показатели</b>
Температура на входе (°C)	40 - 42
Скорость воздушного потока (м <sup>3</sup> /час)	32 - 40
Скорость напыления (г/мин)	3,8 – 4,2
Температура продукта (°C)	38 – 40
Давление при распылении сверху (бар)	1,85 – 1,9
Поддерживаемое давление воздуха (бар)	0,3

**Таблица 7.** Параметры, применяемые при нанесении покрытия на гранулы бифидобактерий

<b>Параметры процесса нанесения покрытия</b>	<b>Показатели</b>
Температура на входе (°C)	40 - 45
Скорость воздушного потока (м <sup>3</sup> /час)	38 - 48
Скорость напыления (г/мин)	1,8 – 2,2
Температура продукта (°C)	40
Давление при распылении сверху (бар)	2,45 – 2,5

*6) Испытание на потерю в массе при высушивании (LOD)*

Во время процесса нанесения покрытия в определенное время (каждые 4% увеличения массы) брали 2 г микрокапсул на испытание LOD (устройство LOD (MB-50-1-250, MRC)).

*7) Испытание на стабильность*

*1) Температурно-влажностный режим:*

Воздействие на непокрытые *Bifidobacterium* и микроинкапсулированные *Bifidobacterium* определенного температурно-влажностного режима (различная температура и влажность) и отбор проб на микробиологический анализ каждую неделю в течение 6 месяцев.

*2) Водная активность 0,795 Aw:*

Воздействие на непокрытые *Bifidobacterium* и микроинкапсулированные *Bifidobacterium* 0,795 Aw (с использованием эксикатора с раствором 0,795 Aw на дне эксикатора) и отбор проб на микробиологический анализ каждые два дня в течение 2 недель.

*3) Водная активность 0,612 Aw:*

Воздействие на непокрытые *Bifidobacterium* и микроинкапсулированные *Bifidobacterium* 0,612 Aw (с использованием эксикатора с раствором 0,795 Aw на дне эксикатора) и отбор проб на микробиологический анализ каждые два дня в течение нескольких недель.

*4) Испытания на скорость пропускания водяного пара (WVTR).*

Данное испытание основано на измерении количества водяного пара, прошедшего через единицу площади образца исследуемой пленки за единицу времени при определенных условиях. Скорость пропускания водяного пара выражается в граммах на квадратный метр за 24 часа [г/(м<sup>2</sup>, 24 ч)]. Для измерения WVTR различных пленок использовали цифровой измеритель WVTR Versaperm MkV (Versaperm Ltd., Maidenhead, UK) с площадью измерения 10 см<sup>2</sup>, оснащенный электролитическим детектирующим датчиком. Испытание проводили при комнатной температуре, 100% влажности в течение 24 часов. Метод был основан на ISO 15106e3:2003. Вкратце, испытуемый образец помещали между двумя разными камерами: сухой камерой и камерой с контролируемой влажностью. Сухая сторона образца обдувается потоком сухого газа-носителя, а водяной пар, проникающий через образец из камеры с контролируемой влажностью, переносится газом-носителем в электролитическую ячейку. Эта ячейка содержит два спиральных проволочных электрода, которые количественно поглощают водяной пар, переносимый газом-носителем, и разлагают его электролитически на водород и кислород под действием постоянного напряжения, приложенного к электродам. По необходимому электролитическому току рассчитывали массу влаги, проникающую через образец и разлагаемую за единицу времени.

*8) Результаты испытания WVTR.*

**Таблица 8.1.** Результаты WVTR пленок различных составов на основе различных соотношений HPS: СВ: октенилсукцинат крахмала.

HPS	Состав		Тип	WVTR (г/м <sup>2</sup> *сут)	
	Масло какао	октенилсукцинат крахмала		Комнатная температура	40°С
60	-	40	K02	-	407
70	-	30	K02	-	348
80	20	-	K02	-	дезинтегрированный
70	10	20	K02	-	363
50	25	25	K02	-	363
50	20	30	K02	-	невозможно
50	30	20	K02	-	327
50	40	10	K02	-	273
70	20	10	X02	-	298
70	15	15	X02	-	328
65	25	10	X02	-	275
60	20	20	X02	212	-
50	25	25	X02	-	невозможно
50	20	30	X02	-	268
50	30	20	X02	-	275
50	40	10	X02	-	337

**Таблица 8.2.** Результаты WVTR пленок различных составов на основе различных соотношений HPS-L (гироксипропилцеллюлоза): СВ: октенилсукцинат крахмала

HPS	Состав		Тип	WVTR (г/м <sup>2</sup> *сут)	
	Масло какао	октенилсукцинат крахмала		Комнатная температура	40 °С
70	10	20	K02	-	247
70	25	5	K02	-	280
50	25	25	K02	180	-
50	20	30	K02	148	-
50	30	20	K02	134	50
60	20	20	K02	478	60
70	20	10	X02	129	330
70	25	5	X02	-	256
70	15	15	X02	145	-
70	5	25	X02	224	-
50	25	25	X02	141	-
50	20	30	X02	201	-
60	20	20	X02	194	-

9) Результаты испытаний на стабильность

1) Стабильность в процессе производства (процесс микроинкапсулирования на основе водного раствора связывающего вещества во время грануляции - формирования сердцевин)

Результаты микробиологического теста показали, что, несмотря на его высокую чувствительность, количество бактерий не уменьшается во время процесса микроинкапсулирования и остается таким же, как и в начале процесса ( $1,5 \times 10^{11}$  КОЕ/г *Bifidobacterium* в начале процесса и  $1,55 \times 10^{11}$  КОЕ/г *Bifidobacterium* в конце) - при 20% увеличении массы (очень значительное достижение).

В Таблице 9 представлены результаты стабильности LGG и другого штамма *Lactobacillus rhamnosus* во время процесса микроинкапсулирования (на основе водного раствора связывающего вещества в процессе формирования сердцевин).

**Таблица 9.** Стабильность (выживаемость) LGG в процессе их микроинкапсулирования

Стадия процесса	Результаты (КОЕ/г бактерий)			
	LGG (содержание бактерий 10% масс./масс.)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (содержание бактерий 10% масс./масс.)		
	20% покрытие: (65:25:10)* (содержание бактерий 10%)	20% покрытие: (55:35:10)* (содержание бактерий 10%)	15% покрытие: (55:35:10)* (содержание бактерий 10%)	15% покрытие: (55:35:10)* (содержание бактерий 15%)
Бактерии без нанесения покрытия	$1,35 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	-
Гранулят (сердцевина)	$1,45 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$
Увеличение массы в ходе процесса нанесения покрытия				
2%	$1,1 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{10}$
4%	$1,16 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{10}$
6%	$5,55 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{11}$	$5,5 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$
8%	$1,15 \times 10^{11}$	$8,3 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$
10%	$8,2 \times 10^{10}$	$4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{10}$
12%	$3 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$
14%	$1,15 \times 10^{11}$	$9,7 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$
16%	$7,9 \times 10^{10}$	$4 \times 10^{10}$	[15%] $2,8 \times 10^{10}$	[15%] $1,4 \times 10^{10}$
18%	$3,1 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^{10}$	-	-
20%	$2,3 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	-	-

\* Состав покрытия: HPS:масло какао:октенилсукцинат крахмала X02

## *2) Непрерывное исследование стабильности с течением времени*

Частицы микроинкапсулированных бактерий как есть [голых (непокрытых)] подвергали воздействию воздуха при комнатной температуре (20-22°C, приблизительно 35-45% относительной влажности) и отбирали образцы в разные моменты времени для количественного теста для определения КОЕ/г бактерий. Результаты сравнивали с чистыми *Bifidobacterium* как есть (немикроинкапсулированные, или незащищенные бактерии), которые находились в тех же условиях. Обобщенные результаты вплоть до 180 суток представлены в Таблице 10.1.

На основании результатов можно четко отметить, что количество *Bifidobacterium* как есть (незащищенные бактерии) всего через три недели снижалось на 4-5 порядков и с течением времени оставалось практически неизменным. Примечательно, что с течением времени на поверхности порошка *Bifidobacterium* в результате прикрепления бактерий друг к другу создается слой, кажущийся жестким и твердым, что проявляется в резком изменении цвета (от почти белого до желтоватого, а позже до светло-коричневого) и ощущений при прикосновении. Полагают, что этот новый слой отвечает за защиту бактерий и за уменьшение снижения их количества с течением времени. Это может быть основной причиной стабилизации коэффициента снижения, выраженного в виде десятичного логарифма, когда он оставался неизменным приблизительно через три недели ( $10^6$ ).

Также можно отметить, что некоторые конкретные микроинкапсулированные препараты бактерий были полностью стабилизированы, поскольку примерно через 13 недель их количество снижалось только на 1 порядок. Этот факт указывает на то, что состав для микроинкапсулирования действительно обеспечивает необходимую защиту от влажности с течением времени.

В Таблице 10.1 приведены результаты количественных тестов, проведенных как на микроинкапсулированных бактериях с использованием различных составов, так и на чистых *Bifidobacterium lactis* (*Bifidobacterium*), хранившихся в голом виде (непокрытых) при комнатной температуре и относительной влажности приблизительно 35-45% в течение разного времени.

Таблица 10.1

Тип образца	Результаты (КОЕ/г ВВ12)																			
	Свежий	1 - 10 дней	10 - 20 дней	20 - 30 дней	30 - 40 дней	40 - 50 дней	50 - 60 дней	60 - 70 дней	70 - 80 дней	80 - 90 дней	90 - 100 дней	100 - 110 дней	110 - 120 дней	120 - 130 дней	130 - 140 дней	140 - 150 дней	150 - 160 дней	160 - 170 дней	170 - 180 дней	180 - 190 дней
ВВ12	1,5 * 10 <sup>11</sup>	WBD	WBD	(27 д) 3,55 * 10 <sup>7</sup>	WBD	(46 д) 2,3 * 10 <sup>3</sup>	(55 д) 2,5 * 10 <sup>7</sup>	(62 д) 6 * 10 <sup>6</sup>	(76 д) 7 * 10 <sup>6</sup>	(83 д) 5 * 10 <sup>6</sup>	(95 д) 3,6 * 10 <sup>5</sup>	(102 д) 3,6 * 10 <sup>5</sup>	(115 д) 4,5 * 10 <sup>6</sup>	(124 д) 2,6 * 10 <sup>6</sup>	(134 д) 3,1 * 10 <sup>6</sup>					
НПС: масло какао:																				
(50:20:30)	1,25 * 10 <sup>11</sup>	WBD	WBD	(27 д) 1,15 * 10 <sup>9</sup>	WBD	(46 д) 1 * 10 <sup>3</sup>	(55 д) 2 * 10 <sup>7</sup>	(62 д) 2,7 * 10 <sup>10</sup> (69 д) 3 * 10 <sup>9</sup>	(76 д) 3 * 10 <sup>7</sup>	(83 д) 1,8 * 10 <sup>6</sup>	(90 д) 7,5 * 10 <sup>6</sup> (97 д) 3,8 * 10 <sup>7</sup>	(104 д) 6,6 * 10 <sup>6</sup>								
(55:35:10) 10% покрытие	1,45 * 10 <sup>11</sup>	(1 д) 1,35 * 10 <sup>11</sup>	WBD	(20 д) 1,0 * 10 <sup>11</sup> (29 д) 3,5 * 10 <sup>10</sup>	(36 д) 8,65 * 10 <sup>10</sup>	(43 д) Приб. 5 * 10 <sup>10</sup>	(50 д) 1,6 * 10 <sup>10</sup> (57 д) 1,1 * 10 <sup>10</sup>	(64 д) 2,25 * 10 <sup>10</sup>	(71 д) 1,5 * 10 <sup>10</sup> (78 д) 1,1 * 10 <sup>10</sup>	(85 д) 1,0 * 10 <sup>10</sup>	(92 д) 1,0 * 10 <sup>10</sup> (99 д) 5,5 * 10 <sup>9</sup>	(108 д) 7,7 * 10 <sup>9</sup>	(115 д) 7 * 10 <sup>9</sup>	(122 д) 6 * 10 <sup>9</sup>	(130 д) 7 * 10 <sup>9</sup>					
НПС + 10% Та*	3,2 * 10 <sup>10</sup>	WBD	(13 д) 3 * 10 <sup>10</sup>	(21 д) 2 * 10 <sup>10</sup> (35 д) 5,7 * 10 <sup>10</sup>	(42 д) 3 * 10 <sup>9</sup>	(56 д) 8 * 10 <sup>9</sup>	(63 д) 2 * 10 <sup>10</sup>	(70 д) 1,5 * 10 <sup>3</sup>	(84 д) 2,5 * 10 <sup>3</sup>	(91 д) 5,5 * 10 <sup>3</sup>	(100 д) 7,5 * 10 <sup>9</sup> (107 д) 9,1 * 10 <sup>3</sup>	(114 д) 2,5 * 10 <sup>9</sup>	(121 д) 7,3 * 10 <sup>8</sup>	(130 д) 1,2 * 10 <sup>3</sup> (130 д) 1,3 * 10 <sup>3</sup>						



				(28 д) 4,5*10 <sup>10</sup>		(49 д) 6*10 <sup>9</sup>			(77 д) 4* 10 <sup>8</sup>											
<b>(55:35:10)</b> <b>10% Та**</b>	8*10 <sup>10</sup>	(1 д) 6,4* 10 <sup>10</sup>	(15 д) Проб. 5*10 <sup>10</sup>	(22 д) 2,5*10 <sup>10</sup>	(36 д) 5*10 <sup>10</sup>	(43 д) 8,2*10 <sup>9</sup>	(50 д) 3*10 <sup>10</sup>	(64 д) 2*10 <sup>10</sup>	(71 д) 5*10 <sup>10</sup>	(80 д) 4,8* 10 <sup>10</sup>	(94 д) 2,3* 10 <sup>10</sup>	(101 д) 9* 10 <sup>9</sup>	(115 д) 7,5* 10 <sup>9</sup>	(122 д) 5,2* 10 <sup>9</sup>	(136 д) 2* 10 <sup>9</sup>					
		(8 д) 1,2* 10 <sup>11</sup>		(29 д) 8,4*10 <sup>10</sup>		(57 д) 1,8*10 <sup>10</sup>			(87 д) 4* 10 <sup>10</sup>			(108 д) 8,5* 10 <sup>9</sup>		(129 д) 4,8* 10 <sup>9</sup>						
<b>(65:25:10)</b>	1,1* 10 <sup>11</sup>	(1 д) 8,2* 10 <sup>10</sup>	(16 д) 6,4* 10 <sup>10</sup>	(23 д) 9*10 <sup>10</sup>	(32 д) 1*10 <sup>11</sup>	(46 д) 7,3* 10 <sup>10</sup>	(53 д) 8,2* 10 <sup>10</sup>	(60 д) 8,2* 10 <sup>10</sup>	(76 д) 1,4* 10 <sup>11</sup>	(83 д) 6,5* 10 <sup>10</sup>	(90 д) 8* 10 <sup>10</sup>	(104 д) 2* 10 <sup>10</sup>	(111 д) 2,5* 10 <sup>10</sup>	(125 д) 1,45* 10 <sup>10</sup>	(132 д) 1,3* 10 <sup>10</sup>	(146 д) 1,2* 10 <sup>10</sup>	(153 д) 1,1* 10 <sup>10</sup>			
		(8 д) 1,1* 10 <sup>11</sup>			(39 д) 8,2* 10 <sup>10</sup>	(67 д) 5,5* 10 <sup>10</sup>	(97 д) 7* 10 <sup>10</sup>		(118 д) 1,5* 10 <sup>10</sup>	(139 д) 1,25* 10 <sup>10</sup>										
(60:30:10)	2*10 <sup>11</sup>	(6 д) 2,5* 10 <sup>11</sup>	(13 д) 3*10 <sup>10</sup>	(20 д) 1*10 <sup>11</sup>	(34 д) 1*10 <sup>11</sup>	(41 д) 6,8* 10 <sup>10</sup>	(55 д) 3,6* 10 <sup>10</sup>	(62 д) 3,5* 10 <sup>10</sup>	(71 д) 5*10 <sup>10</sup>	(85 д) 1*10 <sup>11</sup>	(92 д) 5,5* 10 <sup>10</sup>	(106 д) 1,65* 10 <sup>10</sup>	(113 д) 1,4* 10 <sup>10</sup>	(120 д) 1,2* 10 <sup>10</sup>	(134 д) 4* 10 <sup>9</sup>	(141 д) 3,65* 10 <sup>9</sup>	(162 д) 1,1* 10 <sup>10</sup>	(176 д) 3* 10 <sup>9</sup>	(183 д) 1,9* 10 <sup>9</sup>	
				(27 д) 1,4*10 <sup>11</sup>	(48 д) 9,2* 10 <sup>10</sup>	(78 д) 3,8*10 <sup>10</sup>	(99 д) 2* 10 <sup>10</sup>	(127 д) 4* 10 <sup>9</sup>	(148 д) 1,2* 10 <sup>10</sup>	(190 д) 2,2* 10 <sup>9</sup>										
<b>(55:35:10)</b> <b>(K02) – 10%</b> <b>BB12</b>	1,75* 10 <sup>11</sup>	(6 д) 8*10 <sup>10</sup>	(13 д) 6*10 <sup>10</sup>	(20 д) 1,5*10 <sup>11</sup>	(34 д) 6,8* 10 <sup>10</sup>	(41 д) 1,1* 10 <sup>11</sup>	(55 д) 3* 10 <sup>10</sup>	(64 д) 9,1* 10 <sup>10</sup>	(71 д) 9,5*10 <sup>10</sup>	(85 д) 4,5* 10 <sup>10</sup>	(92 д) 2* 10 <sup>10</sup>	(106 д) 1,4* 10 <sup>10</sup>	(113 д) 1,0* 10 <sup>10</sup>	(120 д) 4,5* 10 <sup>9</sup>	(134 д) 1,3* 10 <sup>10</sup>	(141 д) 1,6* 10 <sup>10</sup>	(155 д) 1,7* 10 <sup>10</sup>	(169 д) 4,5* 10 <sup>9</sup>	(176 д) 2,6* 10 <sup>9</sup>	(183 д) 2,5* 10 <sup>10</sup>
				(27 д) 1,3*10 <sup>11</sup>	(48 д) 5,5* 10 <sup>10</sup>	(78 д) 3,6*10 <sup>10</sup>	(99 д) 2,2* 10 <sup>10</sup>	(127 д) 1,25* 10 <sup>10</sup>												
<b>(70:15:15)</b>	8,5* 10 <sup>10</sup>	(8 д) 1,2* 10 <sup>11</sup>	(15 д) 1,5* 10 <sup>11</sup>	(22 д) 1,36* 10 <sup>11</sup>	(36 д) 2,5* 10 <sup>11</sup>	(43 д) 6,8* 10 <sup>10</sup>	(50 д) 2,7* 10 <sup>10</sup>	(66 д) 4,5* 10 <sup>10</sup>	(73 д) 1,2* 10 <sup>11</sup>	(80 д) 2* 10 <sup>11</sup>	(94 д) 1,8* 10 <sup>10</sup>	(101 д) 1,7* 10 <sup>10</sup>	(115 д) 1,4* 10 <sup>10</sup>	(122 д) 6* 10 <sup>9</sup>	(136 д) 2,25* 10 <sup>10</sup>	-	(150 д) 2,0* 10 <sup>10</sup>	(164 д) 9,1* 10 <sup>9</sup>	(171 д) 3* 10 <sup>9</sup>	(185 д) 6* 10 <sup>9</sup>
				(29 д) 6,3* 10 <sup>10</sup>	(59 д) 1* 10 <sup>11</sup>	(87 д) 2,3* 10 <sup>10</sup>	(108 д) 1,3* 10 <sup>10</sup>	(129 д) 1,6* 10 <sup>10</sup>	(178 д) 3,5* 10 <sup>9</sup>											

(55:35:10) – 20% покрытие	2,9* 10 <sup>11</sup>	(3л)	(19 л)	(26 л)	(33 л)	(40 л) 1,3* 10 <sup>11</sup>	(56 л)	(63 л)	(70 л) 3* 10 <sup>11</sup>	(83 л)	(90 л) 1,15* 10 <sup>11</sup>	(104 л) 1,7* 10 <sup>11</sup>	(111 л) 2*10 <sup>11</sup>	(125 л)	(139 л)	(153 л)	(160 л) 1,2* 10 <sup>11</sup>	(174 л)	(181 л) 1,1* 10 <sup>11</sup>	(195 л)
		3,2* 10 <sup>11</sup>	1,6* 10 <sup>11</sup>	3,2* 10 <sup>11</sup>	3,3* 10 <sup>11</sup>	(49 л) 2,4* 10 <sup>11</sup>	3,3* 10 <sup>11</sup>	2,7* 10 <sup>11</sup>	(77 л) 3* 10 <sup>10</sup>	1,6* 10 <sup>11</sup>	(97 л) 1,5* 10 <sup>11</sup>	(118 л) 1,5* 10 <sup>11</sup>	1,6* 10 <sup>11</sup>	1,3* 10 <sup>11</sup>	1,3* 10 <sup>11</sup>	(167 л) 1,4* 10 <sup>11</sup>	1,4* 10 <sup>11</sup>	(188 л) 9* 10 <sup>10</sup>	3,2* 10 <sup>10</sup>	
(55:35:10) – (65:25:10) – 20% покрытие***	1,1* 10 <sup>11</sup>	(4л) 1*10 <sup>11</sup>	(13 л) 2,8 *10 <sup>9</sup>	(20 л)	(36 л)	(43 л)	(50 л) 2,3* 10 <sup>11</sup>	(64 л)	(71 л) 3* 10 <sup>10</sup>	(85 л)	(92 л) 2,8* 10 <sup>10</sup>	(106 л)	(113 л)	(127 л)	(141 л)	(155 л)	(162 л) 1,5* 10 <sup>10</sup>	(176 л)	(183 л)	
				(27 л) 5,5* 10 <sup>10</sup>	6* 10 <sup>10</sup>	(57 л) 1,9* 10 <sup>11</sup>	1,3* 10 <sup>11</sup>	3* 10 <sup>10</sup>	(99 л) 2,9* 10 <sup>10</sup>	2,4* 10 <sup>10</sup>	2,6* 10 <sup>10</sup>	2,6* 10 <sup>10</sup>	(148 л) 2,7* 10 <sup>10</sup>	1,5* 10 <sup>10</sup>	(169 л) 1,5* 10 <sup>10</sup>	1,2* 10 <sup>10</sup>	9* 10 <sup>9</sup>			
(55:35:10) – 22% покрытие	8,2* 10 <sup>10</sup>	(2 л)	(16 л)	(23 л)	(30 л)	(45 л)	(52 л) 2,7* 10 <sup>10</sup>	(66 л)	(73 л)	(80 л)	(94 л)	(108 л)	(115 л)	(122 л)	(136 л)	(143 л)	(150 л) 1,3* 10 <sup>10</sup>			
		6,9* 10 <sup>10</sup>		1,2* 10 <sup>11</sup>	3,2* 10 <sup>11</sup>	4* 10 <sup>10</sup>	1* 10 <sup>11</sup>	(59 л) 2,8* 10 <sup>10</sup>	2,5* 10 <sup>10</sup>	2,9* 10 <sup>10</sup>	2,8* 10 <sup>10</sup>	2,5* 10 <sup>10</sup>	2,45* 10 <sup>10</sup>	2,6* 10 <sup>10</sup>	1,5* 10 <sup>10</sup>	1,1* 10 <sup>10</sup>	1,4* 10 <sup>10</sup>			
(65:25:10) – K02 – 20% покрытие	7,3* 10 <sup>10</sup>	(2 л)	(16 л)	(23 л)	(30 л)	(44 л)	(51 л) 3,0* 10 <sup>10</sup>	(65 л)	(72 л)	(86 л)	(100 л)	(114 л)	(128 л)	(135 л)	(143 л)					
		8* 10 <sup>10</sup>		3* 10 <sup>11</sup>	4* 10 <sup>10</sup>	3,3* 10 <sup>10</sup>	2,0* 10 <sup>10</sup>	(58 л) 2,8* 10 <sup>10</sup>	2,1* 10 <sup>10</sup>	2,3* 10 <sup>10</sup>	2,0* 10 <sup>10</sup>	-	2,45* 10 <sup>10</sup>	2,3* 10 <sup>10</sup>	1,6* 10 <sup>10</sup>	1,8* 10 <sup>10</sup>	1,4* 10 <sup>10</sup>			
25% HPS + 10% Та*	5,5* 10 <sup>9</sup>	(1 л)	(15 л)	(23 л)	(30 л)	(37 л)	(44 л)	(58 л)	(72 л) 6,8* 10 <sup>9</sup>	(86 л)	(93 л)	(100 л) 2,3* 10 <sup>9</sup>	(113 л)							
		4,5* 10 <sup>9</sup>		1,2* 10 <sup>9</sup>	1,3* 10 <sup>9</sup>	2,1* 10 <sup>9</sup>	1,8* 10 <sup>9</sup>	1,1* 10 <sup>10</sup>	2,1* 10 <sup>9</sup>	2,1* 10 <sup>9</sup>	(79 л) 3* 10 <sup>9</sup>	2,6* 10 <sup>9</sup>	3* 10 <sup>9</sup>	(107 л) 3,8* 10 <sup>9</sup>	1,8* 10 <sup>9</sup>					
(55:35:10) – HPC LF –	1,45*10 <sup>11</sup>	(2 л)	(11 л)	-	(31 л)	(45 л)	(52 л)	(66 л)	(73 л)											
		1,45*	1,1*		3,3	2,7	2,1	1,8	1,4											

20% покрытие****	10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>		10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>											
		(17 д) 1,0* 10 <sup>14</sup>		(38 д) 3,1 10 <sup>10</sup>		(59 д) 2,1 10 <sup>10</sup>													

\* Состав раствора для нанесения покрытия: только НРС и дубильная кислота (Та)

\*\*Покрытие, дополнительно содержащее Та

\*\*\* Двухслойное покрытие, 55:35:10 в качестве внутреннего слоя и 65:25:10 в качестве внешнего слоя

\*\*\*\* вместо НРС использовали НРС LF

Приб. - приблизительно

Таблица 10.2. Влияние типа октенилсукцината крахмала на стабильность микроинкапсулированных *Bifidobacterium lactis* (*Bifidobacterium*), хранившихся в голом виде (непокрытых) при комнатной температуре и относительной влажности приблизительно 35–45% в течение разного времени по сравнению с бактериями в нативном виде (не микроинкапсулированных)

Образец/ состав	Результаты (КОЕ/г ВВ12)																
	свежий	1 - 10 дней	10 - 20 дней	20 - 30 дней	30 - 40 дней	40 - 50 дней	50 - 60 дней	60 - 70 дней	70 - 80 дней	80 - 90 дней	90 - 100 дней	100 - 110 дней	110 - 120 дней	120 - 130 дней	130 - 140 дней	140 - 150 дней	150 - 160 дней
ВВ12	1,5 *10 <sup>11</sup>	-	-	(27 д) 3,55 *10 <sup>7</sup>	-	(46 д) 2,3* 10 <sup>8</sup>	(55 д) 2,5*10 <sup>7</sup>	(62 д) 6*10 <sup>6</sup>	(76 д) 7*10 <sup>6</sup>	(83 д) 5*10 <sup>6</sup>	(95 д) 3,6*10 <sup>6</sup>	(102 д) 3,6*10 <sup>6</sup>	(115 д) 4,5*10 <sup>6</sup>	(124 д) 2,6*10 <sup>6</sup>	(134 д) 3,1*10 <sup>6</sup>	WBD	WBD
(55:35:10)* – X02	1,45 *10 <sup>11</sup>	(1 д) 1,35 *10 <sup>11</sup>	-	(20 д) 1,0*10 <sup>11</sup>	(36 д) 8,65*	(43 д) Приб. 5*10 <sup>10</sup>	(50 д) 1,6*10 <sup>10</sup>	(64 д) 2,25*	(71 д) 1,5* 10 <sup>10</sup>	(85 д) 1,0*	(92 д) 1,0* 10 <sup>10</sup>	(108 д) 7,7*	(115 д) 7*	(122 д) 6*	(130 д) 7*	WBD	WBD
				(29 д) 3,5*10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	(57 д) 1,1*10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>		(78 д) 1,1* 10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	(99 д) 5,5* 10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>		
(55:35:10) – K02	1,75* 10 <sup>11</sup>	(6 д) 8*10 <sup>10</sup>	(13 д) 6*10 <sup>10</sup>	(20 д) 1,5*10 <sup>11</sup>	(34 д) 6,8* 10 <sup>10</sup>	(41 д) 1,1* 10 <sup>11</sup>	(55 д) 3* 10 <sup>10</sup>	(64 д) 9,1* 10 <sup>10</sup>	(71 д) 9,5* 10 <sup>10</sup>	(85 д) 4,5*	(92 д) 2* 10 <sup>10</sup>	(106 д) 1,4*	(113 д) 1,0*	(120 д) 4,5* 10 <sup>9</sup>	(134 д) 1,3*	(141 д) 1,6* 10 <sup>10</sup>	(155 д) 1,7* 10 <sup>10</sup>
									(78 д) 3,6* 10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	(99 д) 2,2* 10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	(127 д) 1,25* 10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>

\* Состав раствора для нанесения покрытия: HPS: Масло какао: SOS (октенилсукцинат крахмала)

Приб. - приблизительно

Таблица 10.2. Результаты количественных тестов, проведенных как на микроинкапсулированных бактериях, так и на чистых LGG, хранившихся в голем виде (непокрытых) при комнатной температуре и относительной влажности приблизительно 35–45% в течение разного времени.

Тип образца	Таблица 10.2 - Результаты (КОЕ/ г бактерий)													
	свежий	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LGG без покрытия	1,35 *10 <sup>11</sup>	1,2 *10 <sup>11</sup>	1,5 *10 <sup>10</sup>	5,5 *10 <sup>9</sup>	1 *10 <sup>9</sup>	1,1 *10 <sup>9</sup>	9,5 *10 <sup>8</sup>	3,2 *10 <sup>8</sup>	1,2 *10 <sup>6</sup>	1,2 *10 <sup>6</sup>	4,5 *10 <sup>7</sup>	2,4 *10 <sup>4</sup>	1,3 *10 <sup>6</sup>	0
(65:25:10) – 20%	2,3 *10 <sup>10</sup>	1,2 *10 <sup>10</sup>	3,2 *10 <sup>10</sup>	4 *10 <sup>10</sup>	2,2 *10 <sup>10</sup>	2,8 *10 <sup>10</sup>	2,2 *10 <sup>10</sup>	2,1 *10 <sup>10</sup>	1,4 *10 <sup>10</sup>	8 *10 <sup>8</sup>	8,6 *10 <sup>8</sup>	1,3 *10 <sup>9</sup>	3 *10 <sup>9</sup>	1,3 *10 <sup>9</sup>

Таблица 10.3. Стабильность ВВ12 и микроинкапсулированных ВВ12 с течением времени при AW 0,612.

Тип образца	Результаты (КОЕ/ г ВВ12)										
	Свежий	2 дня	4 дня	7 дня	9 дней	11 дней	14 дней	16 дней	18 дней	21 день	25 дней
ВВ12	$1,5 \cdot 10^{11}$	$3,2 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$	$1,55 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^5$	-
(55:35:10)	$1,45 \cdot 10^{11}$	$7,3 \cdot 10^{10}$	$5,6 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$	$4,8 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	-
(65:25:10)	$1,1 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$8,6 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$4,8 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^5$	-
(55:35:10) – 20% покрытие	$3,2 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{11}$	$1,9 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$
(65:25:10) – K02 – 20% покрытие	$7,3 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$2,7 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$

Таблица 10.4. Стабильность ВВ12 и микроинкапсулированных ВВ12 с течением времени при AW 0,795.

Тип образца	Результаты (КОЕ/ г ВВ12)										
	свежий	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	7 дней	8 дней	9 дней	10 дней	11 дней	14 дней
ВВ12	$1,5 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{11}$	$9,5 \cdot 10^9$	$7,3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$8,2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^3$
	$1,5 \cdot 10^{11}$	$5,6 \cdot 10^{10}$	$2,7 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	-	$5,5 \cdot 10^4$			
(50:20:30)	$1,25 \cdot 10^{11}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	$9,55 \cdot 10^{10}$	$8,2 \cdot 10^{10}$	$4,5 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^4$
(55:35:10)	$1,45 \cdot 10^{11}$	$2,9 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{11}$	$8,4 \cdot 10^{10}$	$4,1 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^3$
HPS + 10% Та	$3,2 \cdot 10^{10}$	$3,2 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$3,4 \cdot 10^{10}$	$4,3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^3$	0	0

(55:35:10) 10% Ta	$8 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$7 \cdot 10^{10}$	$6,4 \cdot 10^{10}$	$5,9 \cdot 10^9$	$7,75 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^4$	0	0
(65:25:10)	$1,1 \cdot 10^{11}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$9,3 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$8,2 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$
(60:30:10)	$2 \cdot 10^{11}$	$1,15 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$8,2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^3$
(70:15:15)	$8,5 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^{10}$	$1,45 \cdot 10^{10}$	$2,2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$
(55:35:10) – 20% покрытие	$3,2 \cdot 10^{11}$	$2,25 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{11}$	$2,9 \cdot 10^{11}$	$2,45 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$2,3 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^2$
(55:35:10) – (65:25:10) – 20% покрытие	$1,1 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{11}$	$9,1 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{10}$	$2,8 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	0
(55:35:10) (K02)	$1,75 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$6,4 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^6$
(55:35:10) – 22% покрытие	$8,2 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$

4) *Измерение содержания воды с течением времени*

Содержание воды в микроинкапсулированных препаратах бактерий определенного состава в сравнении с чистыми бактериями, находившимися в одинаковых условиях при непрерывном изучении стабильности, также оценивали по потере в массе при высушивании (LOD). Следует отметить, что любое увеличение содержания воды может указывать на поглощение воды порошком и, следовательно, на плохую барьерную способность. Напротив, отсутствие изменения значения LOD может означать хорошую защиту от влажности.

Результаты определения содержания воды обобщены в Таблице 11 и графически проиллюстрированы на Фиг. 1 для ВВ-12.

**Таблица 11.1.** Содержание воды (поглощение влаги), измеренное в микроинкапсулированных *Bifidobacterium*, хранившихся при комнатной температуре, относительной влажности приблизительно 35-45% с течением времени по сравнению с *Bifidobacterium* как есть.

Описание образца	Таблица 11.1 - LOD (%)								
	0 ч	24 ч	96 ч	120 ч	144 ч	168 ч	192 ч	2 нед	3 нед
Бифидобактерии	4,2	9,0	10,1	10,2	10,0	10,1	9,5	8,0	9,2
Микроинкапсулиро ванные бифидобактерии, лот# 30082017	4,8	5,9	5,4	5,3	6,1	6,1	5,9	5,6	5,8

Следует обратиться к Фиг. 1, где показано содержание воды в микроинкапсулированных препаратах бактерий определенного состава в сравнении с чистыми бактериями, находившимися в одинаковых условиях при непрерывном изучении стабильности, которое также оценивали по потере в массе при высушивании (LOD).

Как показано на Фиг. 1, микроинкапсулированный состав обеспечивает надлежащий барьер против поглощения влаги, и, следовательно, значительного увеличения содержания воды в микроинкапсулированных *Bifidobacterium* с течением времени не наблюдалось. Напротив, незащищенные бактерии после 24-часового



пребывания на воздухе поглощали около 114% влаги, которая оставалась почти постоянной с течением времени.

Тот же эксперимент проводили как с незащищенными (LGG как есть), так и с микроинкапсулированными LGG, результаты продемонстрированы в Таблице 11.2.

**Таблица 11.2.** Содержание воды (поглощение влаги), измеренное в микроинкапсулированных LGG, хранившихся при комнатной температуре, относительной влажности приблизительно 35-45% с течением времени по сравнению с LGG как есть.

Тип образца	LOD (%)							
	Время 0	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед	6 нед	7 нед
L. rhamnosus без покрытия	4,8	12,8	13	12,6	11,5	11,2	11	12,6
микроинкапсулированные L. rhamnosus	4,6	4,5	4,2	5	3,9	5,2	4,2	4,4

Хотя это изобретение описано на некоторых конкретных примерах, возможно множество модификаций и вариаций. Поэтому понятно, что в рамках прилагаемой формулы изобретения изобретение может быть реализовано иначе, чем конкретно описано.

Пример 2. Воплощения композиций сердцевины и покрытия (формирование сердцевины на основе расплава)

Сердцевину получали методом гранулирования из расплава. Расплавленное жидкое связывающее вещество (например, масло какао) распыляли на порошковую смесь, состоящую из бактерий и наполнителя, для консолидации частиц с образованием агломератов. Компоненты, используемые для приготовления микрокапсул, представлены в Таблице 12.

**Таблица 12.** Композиция микрокапсул согласно одному из воплощений данного изобретения

Название материала	Название продукта	Поставщик	Применение	содержание в готовой микрокапсуле, % масс./масс.
Lactobacillus Rhamnosus	Lactobacillus rhamnosus		бактерии	10 - 60
лактоза	Pharmatose 100M Моногидрат лактозы (сшитый)	DFE Pharma	наполнитель	25 - 67
мальтодекстрин	MALDEX G190 PHARMA	TEROSE SYRAL	наполнитель	0 - 5
HPS	EMDEN ESH 15	EMSLAND GROUP	покрытие	10 - 11
масло какао	масло какао	Lubeca Germany	покрытие / плавкое связывающее вещество	4 - 15
октенилсукцинат крахмала	октенилсукцинат крахмала X02, K02	EMSLAND GROUP	Покрытие	1,8

**Таблица 13.** Параметры, применяемые при гранулировании Lactobacillus rhamnosus из расплава

Параметры нанесения покрытия	Показатели
Температура на входе (°C)	Комнатная температура
Скорость воздушного потока (м <sup>3</sup> /ч)	25 – 40
Жидкостный насос (об/мин)	35 – 70
Температура продукта (°C)	30 – 32
Давление при распылении сверху (бар)	0,5 – 0,8
Поддерживаемое давление воздуха (бар)	-

**Таблица 14.** Параметры, применяемые при нанесении покрытия на гранулы  
*Lactobacillus rhamnosus*

Параметры нанесения покрытия	Показатели
Температура на входе (°С)	34 – 40
Скорость воздушного потока (м <sup>3</sup> /ч)	38 – 60
Скорость распыления (г/мин)	1,8 – 2,2
Температура продукта (°С)	34 – 39
Давление при распылении сверху (бар)	2,45 – 2,5

*Стабильность в ходе процесса получения*

Отбирали образцы для количественного определения стабильности бактерий (*Lactobacillus rhamnosus*) в ходе процесса микроинкапсулирования. Обобщенные результаты представлены в Таблице 15.

**Таблица 15.** Стабильность (выживаемость) *Lactobacillus rhamnosus* в процессе их микроинкапсулирования с применением гранулирования из расплава.

Стадия процесса	Результаты (КОЕ/г бактерий)			
	10% покрытие: (55:35:10)* [содержание бактерий 10% масс./масс.]	16% покрытие: (55:35:10)* [содержание бактерий 35% масс./масс.]	10% покрытие: (55:35:10)* [содержание бактерий 50% масс./масс.]	10% покрытие: (55:35:10)** [содержание бактерий 50% масс./масс.]
Бактерии без покрытия	$2,4 \cdot 10^{11}$	$2,4 \cdot 10^{11}$	$2,4 \cdot 10^{11}$	$2,4 \cdot 10^{11}$
Гранулят	$1,6 \cdot 10^{11}$	$3,0 \cdot 10^{11}$	$3,0 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{11}$
Увеличение массы в ходе процесса нанесения покрытия				
2%	$8,5 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{11}$	$3,0 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{11}$
4%	$6,9 \cdot 10^{10}$	$8,4 \cdot 10^{10}$	$3,3 \cdot 10^{11}$	$6,8 \cdot 10^{10}$
6%	$7,0 \cdot 10^{10}$	$8,5 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$
8%	$8,6 \cdot 10^{10}$	$9,1 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$
10%	$5,1 \cdot 10^{10}$	$8,3 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{11}$

12%	-	$7,2 \cdot 10^{10}$	-	
14%	-	$5,5 \cdot 10^{10}$	-	
16%	-	$5,0 \cdot 10^{10}$	-	
18%	-	-	-	
20%	-	-	-	

\* Состав для нанесения покрытия: HPS:масло какао:октенилсукцинат крахмала X02

\*\* Состав для нанесения покрытия: HPS:стеариновая кислота:октенилсукцинат крахмала X02

Хотя это изобретение описано на некоторых конкретных примерах, возможны его многочисленные модификации и вариации. Поэтому следует понимать, прилагаемая формула изобретения охватывает варианты реализации изобретения, отличающиеся от конкретных воплощений, описанных в данном документе.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1.** Пробиотическая микрокапсула, содержащая:  
сердцевину, содержащую пробиотические микроорганизмы, и  
слой покрытия, содержащий гибридную твердую дисперсию, содержащую съедобную жирную молекулу, равномерно распределенную в водорастворимом пленкообразующем полимере, и съедобный медиатор, представляющий собой октенилсукцинат крахмала.
- 2.** Пробиотическая микрокапсула по п. 1, где указанный водорастворимый пленкообразующий полимер представляет собой гидроксипропилкрахмал.
- 3.** Пробиотическая микрокапсула по п. 2, где указанные пробиотические микроорганизмы включают *Bifidobacterium*.
- 4.** Пробиотическая микрокапсула по п. 3, где указанная съедобная жирная молекула выбрана из группы, включающей лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитат, пальмитолеат, гидроксипальмитат, арахидиновую кислоту, олеиновую кислоту, стеариновую кислоту, стеарат натрия, стеарат кальция, стеарат магния, гидроксидоктакозанила гидроксистеарат, длинноцепочечные сложные эфиры олеиновой кислоты, сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, эстерифицированные жирные диолы, гидроксированные жирные кислоты, гидрогенизированные жирные кислоты (насыщенные или частично насыщенные жирные кислоты), частично гидрогенизированное соевое масло, частично гидрогенизированное хлопковое масло, алифатические спирты, фосфолипиды, лецитин, фосфатидилхолин, триэфиры жирных кислот, кокосовое масло, гидрогенизированное кокосовое масло, масло какао; пальмовое масло; эвтектические смеси жирных кислот; моно- и диглицериды, полочсамеры, блок-сополимеры полиэтиленгликоля и сложные полиэфиры или их комбинацию.
- 5.** Пробиотическая микрокапсула по п. 4, где указанная молекула съедобного жира представляет собой масло какао.
- 6.** Пробиотическая микрокапсула по п. 4, где указанная молекула съедобного жира представляет собой стеариновую кислоту.
- 7.** Пробиотическая микрокапсула по п. 1, где указанная гибридная твердая дисперсия представляет собой единую гибридную твердую дисперсию.
- 8.** Способ получения микрокапсулы, включающий:  
приготовление сердцевины микрокапсулы, содержащей *Bifidobacterium*;

приготовление по меньшей мере одного покрытия с низкими значениями скорости пропускания водяного пара (WVTR), содержащего гидроксипропилкрахмал (HPS), масло какао (CB) и октенилсукцинат крахмала, и

нанесение на указанную сердцевину указанного по меньшей мере одного покрытия.

**9.** Способ по п. 8, в котором приготовление по меньшей мере одного покрытия включает

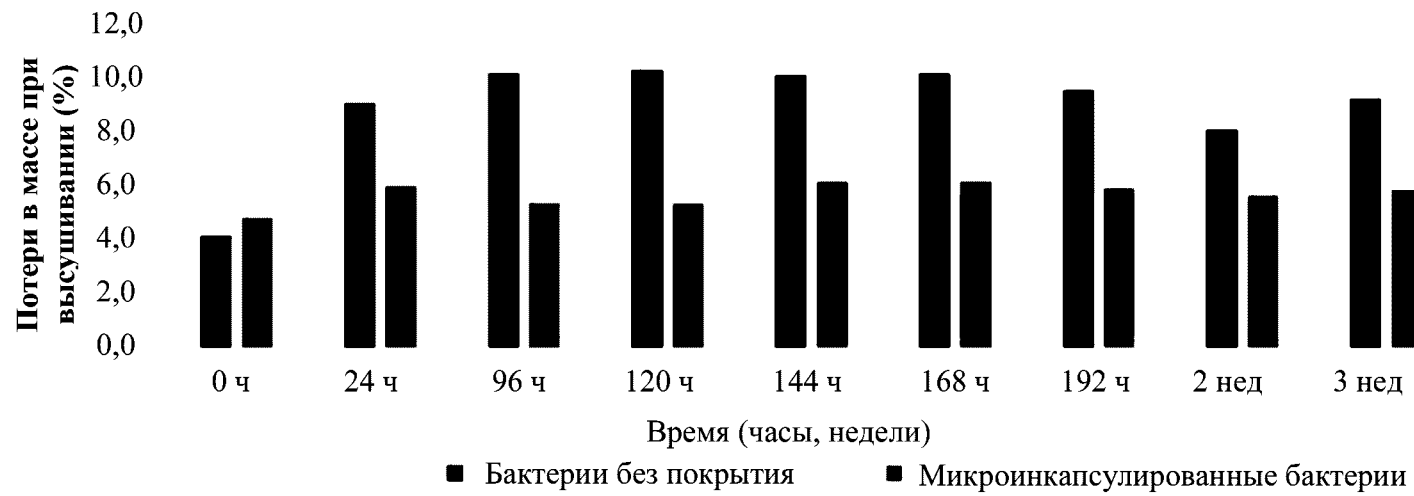
приготовление 5% масс./масс. раствора гидроксипропилкрахмала (HPS) путем добавления HPS к нагретой дистиллированной воде (85-90°C);

получение раствора октенилсукцината крахмала (SOS) путем добавления SOS к нагретой дистиллированной воде и непрерывного перемешивания до получения однородного прозрачного раствора;

предварительное плавление масла какао (CB) при перемешивании с использованием механической мешалки с получением расплавленного CB; и

гомогенизацию указанного раствора SOS и указанного расплавленного CB в указанном 5% масс./масс. растворе HPS с использованием гомогенизатора.

**10.** Способ по п. 9, в котором предварительное плавление указанного масла какао (CB) осуществляют при 50°C.



Фиг. 1