

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 606

doi: 10.17223/19988591/59/2

Влияние микрокапсулированных стартовых культур на образование биологически активных пептидов в готовых мясных продуктах

Дмитрий Алексеевич Афанасьев¹, Ирина Михайловна Чернуха²,
Вера Ивановна Ганина³, Наталья Геннадьевна Машенцева⁴,
Леонид Иванович Ковалев⁵, Анна Владиславовна Коврижных⁶,
Махбубех Ахангаран⁷, Махмуд Гаравири⁸

^{1, 2} Федеральный научный центр им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

³ Московский государственный университет технологий и управления
им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

^{4, 6, 7, 8} Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр биотехнологии, Институт биохимии
им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

¹ dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

² imcher@inbox.ru

³ vigan5428@yandex.ru

⁴ natali-mng@yandex.ru

⁵ kovalyov@inbi.ras.ru

⁶ anya-1998@mail.ru

⁷ ahangaran@hotmail.com

⁸ gharaviri@hotmail.com

Аннотация. Особое значение в производстве ферментированных мясных продуктов играют стартовые культуры, посредством протеолитической системы которых происходит протеолиз белков мясного сырья с образованием коротких пептидов, обуславливающих качественные и функциональные характеристики готового продукта. Однако существуют некоторые технологические сложности в применении бактерий, способствующих образованию биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах. Решением этой проблемы может стать микрокапсулирование. В данном исследовании подобраны промышленно ценные штаммы стартовых культур, а также предложена технология их микрокапсулирования, основанная на заключении клеток в капсулы из 5%-го раствора альгината натрия. При оценке термостабильности капсул определено, что штаммы сохраняют свою активность в пределах от 30 до 90%. Исследован белковый профиль образцов вареных колбас, выработанных с применением микрокапсулированных стартовых культур. Результаты протеомного исследования свидетельствуют об изменениях в белках актомиозинового комплекса и ферментах мышечной ткани.

Ключевые слова: стартовые культуры, микрокапсулирование, альгинат натрия, мясное сырье, протеомика, биологически активные пептиды

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-10073).

Для цитирования: Афанасьев Д.А., Чернуха И.М., Ганина В.И., Машенцева Н.Г., Ковалев Л.И., Коврижных А.В., Ахангаран М., Гаравири М. Влияние микрокапсулированных стартовых культур на образование биологически активных пептидов в готовых мясных продуктах // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2022. № 59. С. 42–63. doi: 10.17223/19988591/59/2

Original article

doi: 10.17223/19988591/59/2

The Effect of Microencapsulated Starter Cultures on the Formation of Biologically Active Peptides in Finished Meat Products

Dmitry A. Afanasev¹, Irina M. Chernukha², Vera I. Ganina³,
Natalya G. Mashentseva⁴, Leonid I. Kovalev⁵, Anna V. Kovrizhnykh⁶,
Mahboobeh Ahangaran⁷, Mahmud Gharaviri⁸

^{1,2} *Gorbatov Federal Center for Food Systems RAS, Moscow, Russia*

³ *Razumovsky Moscow State University of Technology and Management, Moscow, Russia*

^{4,6,7,8} *Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia*

⁵ *Federal Research Center for Biotechnology, Bakh Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia*

¹ *dmitr.afanasjew2010@yandex.ru*

² *imcher@inbox.ru*

³ *vigan5428@yandex.ru*

⁴ *natali-mng@yandex.ru*

⁵ *kovalyov@inbi.ras.ru*

⁶ *anya-1998@mail.ru*

⁷ *ahangaran@hotmail.com*

⁸ *gharaviri@hotmail.com*

Summary. Of particular importance in the production of fermented meat products are starter cultures with a proteolytic system that promotes the proteolysis of the protein components of meat raw materials. Numerous compounds, which may have biological activity, were formed as a result of the proteolysis, for example, biologically active peptides or bacteriocins. Nevertheless, there are some technological difficulties in the use of bacteria that contribute to the formation of biologically active peptides in raw meat. The solution to this problem can be microencapsulation. In this study, industrially valuable strains of starter cultures were selected, and proteolytic activity genes were identified. Thus, the proteolytic genes of the PRTB10/PRTB20 and P15C/P06C families were found in the *P. acidilactici* 38 and *P. pentosaceus* 28 strains, while the genes of the Jp23/Jp25 and prt2/IP6Xba families were found in the *L. acidophilus* AT-45 strain. The prt2/IP6Xba genes were also found in the *S. carnosus* 111-2 strain. A technology is proposed for incorporating microorganisms into alginate capsules with an alginate gel concentration of 5%, which makes it possible to form strong capsules capable of maintaining the viability of starter cultures in the production of boiled sausage: when incubating heat-treated capsules to 72 °C on chalk agar, the survival rate of microorganisms from 30 to 90% was recorded. The protein profile of the samples of boiled sausages produced using microencapsulated starter cultures was studied. A significant interaction of some strains with proteins of the actomyosin complex was shown, and the enzymes of energy metabolism from muscle tissue were subjected to destructive changes – muscle creatine phosphate kinase, enolase, and adenylate kinase 1.

The paper contains 4 Figures, 4 Tables, and 27 References.

Keywords: starter cultures, microencapsulation, sodium alginate, raw meat, proteomics, biologically active peptides

Funding: This work was partially supported by the Russian Science Foundation (Project No.16-16-10073)

For citation: Afanasev DA, Chernukha IM, Ganina VI, Mashentseva NG, Kovalev LI, Kovrizhnykh AV, Ahangaran M, Gharaviri M. The Effect of Microencapsulated Starter Cultures on the Formation of Biologically Active Peptides in Finished Meat Products. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2022;59:42-63. doi: 10.17223/19988591/59/2. In Russian, English Summary

Актуальность

Интерес к природным пептидам в значительной степени обусловлен их необычно высокой биологической активностью. Они оказывают мощное фармакологическое воздействие на множество физиологических функций организма, что делает их ценными компонентами лечебно-профилактического питания. В то же время отмечены их низкая стабильность и быстрый распад в организме при физиологических значениях pH среды, что требует разработки более качественных методов их сохранения, например путем иммобилизации [1].

Немаловажной проблемой также является разработка методов выделения и идентификации биологически активных пептидов ввиду широкого спектра их функциональных свойств. Наиболее точным методом оценки эффективности и физиологических функций пептидов мясного происхождения являются клинические испытания с участием людей, однако такие исследования характеризуются сложностью, длительностью и значительными экономическими затратами. Экспериментальный дизайн может быть упрощен путем использования методов биоинформатики для компьютерного моделирования *in silico*, объединяющих инструменты биоинформатики и базы данных о пептидах. Данные методы являются более выгодными в плане экономики, менее энергоемкими и эффективными альтернативами эмпирических методов [2].

Существенное влияние на образование биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах оказывают стартовые культуры, в особенности молочнокислые бактерии и денитрифицирующие стафилококки, широко используемые в мясном производстве. Физиологическое наличие у этих культур широкого спектра ферментативных активностей, в особенности протеолитических ферментов эндо- и экзотипов, позволяет им в разной мере гидролизовать саркоплазматические и миофибриллярные белки мышечной ткани с образованием низкомолекулярных продуктов гидролиза, среди которых могут идентифицироваться и биологически активные пептиды.

Пептиды, образуемые молочнокислыми бактериями, включают рибосомально продуцируемые бактериоцины и продукты гидролиза белков –

биоактивные пептиды, которые могут выполнять функции природных консервантов и нутрицевтиков соответственно [3].

Биологически активные пептиды могут быть получены из субстратных белков под действием внутримембранных протеаз стартовых культур. Биоактивные пептиды являются внеклеточными, поскольку они представляют собой белковые остатки, которые не используются протеолитической системой молочнокислых бактерий для ассимиляции азота. В ряде случаев необходим лизис клеток, в результате которого ферменты, участвующие в протеолизе и генерации биоактивных пептидов, высвобождаются [4].

Способность штаммов молочнокислых бактерий образовывать биоактивные пептиды основана на гидролитических реакциях, производимых ферментами, участвующими в этом процессе. Новые технологии, такие как транскриптомная и протеомная, предоставили информацию, объясняющую этот сложный процесс. Ферменты, непосредственно участвующие в образовании биоактивного пептида, – это протеиназы, связанные с клеточной стенкой (семейство PrtP), с молекулярной массой порядка 200 кДа. Данные протеазы также могут быть внеклеточными. Гены PrtP могут быть обнаружены в *Lactococcus lactis* на уровне плазмид и в хромосоме *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*. На экспрессию протеиназ PrtP влияют различные факторы в зависимости от штамма LAB. Например, у *L. lactis* BGMN1-5 экспрессия протеиназы зависела от концентрации казеинового пептона в питательной среде [5], тогда как у *Lactobacillus helveticus* H9 два разных паттерна экспрессии гена PrtP идентифицированы во время фазы роста и были связаны с расщеплением альфа- и бета-казеинов [6]. Различия, обнаруженные в протеиназах молочнокислых бактерий, объясняют разнообразие образующихся биоактивных пептидов, даже когда используется один и тот же белковый матрикс, и их состав зависит от аминокислотной специфичности, в которой проводится гидролитическая ферментативная реакция.

Существуют некоторые серьезные проблемы с применением биоактивных пептидов, связанные с их структурными характеристиками и экономическими затратами на производство [7]. Ферментация молочнокислых бактерий считается экономичным и масштабируемым способом получения биоактивных пептидов, но как только устанавливаются оптимальные условия роста бактерий, которые способствуют высвобождению биоактивных пептидов, наступает этап, когда начинаются такие нежелательные модификации в сырье, как деградация и денатурация, влияющие на биоактивность. Как и в случае бактериоцинов, методы инкапсуляции могут способствовать не только повышению их стабильности, но и усилению их транспорта через клеточную мембрану [8].

Принимая во внимание доступность полных бактериальных геномов онлайн, теоретические исследования функциональности генных кластеров различных молочнокислых бактерий требуют меньше времени, чем классические методы обнаружения функциональных пептидов.

Потенциал биоактивных пептидов на основе молочнокислых бактерий можно предсказать двумя способами: (а) геномный анализ компонентов протеолитической системы молочнокислых бактерий для выявления различных ферментативных активностей или субэлементов и их стратегических особенностей и (б) подход *in silico* с использованием методов количественного соотношения структура – активность (QSAR) для оценки белкового матрикса, который может высвобождать биоактивные пептиды [9]. Объединение биоинформационных инструментов с экспериментальными результатами обеспечивает основу для прогноза потенциального пептида и может служить для выбора из больших количеств штаммов молочнокислых бактерий.

Образование биоактивных пептидов зависит от ферментативной активности микроорганизма. Как и в случае бактериоцинов, факторы, влияющие на биосинтез ферментов, специфичны для штамма. На молекулярном уровне на экспрессию протеолитической системы влияет наличие белков, аминокислот и углерода. Кроме того, на уровень синтеза ферментов влияет фаза роста микроорганизмов – активность сохраняется в течение экспоненциальной фазы и в начальный период стационарной фазы, но уменьшается в ходе прогрессирования стационарной фазы. Также изменения ферментативной активности связаны с целостностью бактериальных клеток – ферментативная активность внутриклеточных экстрактов будет существенно ниже ферментативной активности целой живой клетки.

При выработке ферментированных колбасных изделий со стартовыми культурами их пептидный профиль значительно изменяется. Так, рост микроорганизмов в мясной системе на стадии ферментации приводит к уменьшению концентрации пептидов с молекулярными массами свыше 3 кДа и увеличению образования низкомолекулярных пептидов с молекулярными массами ниже 3 кДа, что позволяет сделать предположение о возможном наличии у них биологической активности.

Тем не менее, как указано выше, существуют некоторые сложности с применением биоактивных пептидов, связанные с их структурными характеристиками и экономическими затратами на производство [10]. Так, установление оптимальных условий для роста культур, повышающих к тому же их способность к гидролизу мышечных белков, может отрицательно сказаться на биологической активности продуктов гидролиза. Данную проблему можно решить, используя методы микрокапсулирования. Включение стартовых культур в микрокапсулы может не только повысить их жизнеспособность, но и способствовать повышению стабильности и увеличению эффективности транспортировки через клеточную мембрану их метаболитов.

Также использование стартовых культур в мясной промышленности ограничивается производством сырых ферментированных мясopодуков и изделий с длительной осадкой. Это связано с потерей жизнеспособности стартовых культур после термической обработки. При нагреве продукта до температуры 70 ± 2 °C в процессе тепловой обработки наблюдается практи-

чески полное прекращение роста мезофильной и частично термофильной микрофлоры и спорообразующих бактерий в вегетативной форме. Поэтому, на наш взгляд, решением такой проблемы будет использование микрокапсулированных стартовых культур, способных сохранять свою жизнедеятельность во время технологического процесса. У микрокапсулированных стартовых культур усиливается синтез вторичных метаболитов (ферментов, бактериоцинов), которые проникают через капсулу и попадают в мясное сырье [11]. В связи с этим целью данного исследования являлось изучение влияния микрокапсулированных стартовых культур на образование биоактивных пептидов в вареных колбасах.

Материалы и методы

Культивирование клеток микроорганизмов. Культивирование выбранных штаммов осуществлялось в течение 24–48 ч при температуре 37 ± 1 °C на плотной питательной среде de Man, Rogosa и Sharpe (MRS), pH среды – $6,2 \pm 0,2$ при 25 ± 1 °C [12]. Отобранные штаммы представлены в табл. 1.

Таблица 1 [Table 1]

Промышленно ценные штаммы микроорганизмов, используемые в работе [Industrially valuable strains of microorganisms used in the work]

№ п/п [No.p/p]	Штамм [Strain]	Номер ВКПМ [VKPM number]
1	<i>Latilactobacillus sakei</i> 105	B-8905
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> AT-41	B-6545
3	<i>Latilactobacillus curvatus</i> 1	B-8889
4	<i>Latilactobacillus sakei</i> 103	B-8932
5	<i>Latilactobacillus curvatus</i> 2	B-8906
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> 38	B-8902
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 28	B-8888
8	<i>Staphylococcus carnosus</i> 111-2	B-8950

ПЦР протеолитических штаммов. Скрининг протеолитических генов исследуемых штаммов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию образцов проводили на амплификаторе «T100™ Thermal Cycler» (BIO-RAD, Бангладеш). Детекцию ПЦР-амплификационной смеси осуществляли путем электрофоретического разделения в агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием. Визуализацию электрофоретической картины проводили в системе геледокументирования Gel Doc XR+ (BIO-RAD, США).

Исследование термостабильности микрокапсул и заключенных в них стартовых культур. Для определения термостабильности выбранных микрокапсулированных стартовых культур проведена термическая обработка капсул – нагрев до 72 ± 1 °C. Для более равномерного прогрева капсулы помещали в дистиллированную воду с температурой 25 ± 1 °C, после достижения температуры воды 72 ± 1 °C прогрев продолжали еще в течение

5 мин. По завершении термической обработки капсулы остужали и помещали в стерильные чашки Петри в количестве 10 штук в каждую, а затем заливали охлажденным стерильным меловым агаром (*опыт*).

Аналогичным образом меловым агаром заливали капсулы, не подвергнутые тепловой обработке (*контроль*). Состав мелового агара (МА) (г/л): протеозопептон – 5,0, дрожжевой экстракт – 10,0, лактоза – 10,0, глюкоза – 10,0, кальция карбонат – 5,0, агар – 12,0. Инкубация чашек осуществлялась в течение 48 ч при температуре 37±2 °С. О результатах судили по количеству капсул, вокруг которых образовалась зона просветления, обусловленная нейтрализацией кальция в среде молочной кислотой, которую синтезировали микрокапсулированные стартовые культуры.

Выработка вареной колбасы. В полупроизводственных условиях ФГБОУ ВО «МГУПП» осуществлена выработка вареной колбасы «Докторская» по ГОСТ 23670–2019 Изделия колбасные вареные мясные. Технические условия (Russian Standard). Технические условия (Russian Standard), а также с внесением в рецептуру (табл. 2) микрокапсулированных клеток.

Таблица 2 [Table 2]

Рецептура вареной колбасы «Докторская» по ГОСТ 23670 с микрокапсулами
[Recipe for boiled sausage "Doctorskaya" according to GOST 23670 with microcapsules]

№ п/п [No.p/p]	Сырье/ингредиенты [Raw materials/ingredients]	Содержание на 100 кг [Content per 100 kg]
Несоленое сырье, кг		
1	Говядина жилованная в/с	25,0
2	Свинина жилованная п/ж	70,0
3	Меланж	3,0
4	Молоко коровье сухое	2,0
Итого		100,0
5	Влага на сырье (+лед)	20,0
Итого		120,0
Пряности, г		
6	Нитритно-посолочная смесь	2090,0
7	Сахар-песок	200,0
8	Мускатный орех молотый	50,0
9	Капсулы	500,0

Протеомное исследование. Состояние белкового профиля вареных колбас с микрокапсулами исследовали с помощью двумерного электрофореза (2ДЭ) по О'Фарреллу [13] с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте рН (IEF-PAGE); последующую детекцию белков проводили окрашиванием бромфеноловым синим СВВ R-250 и азотнокислым серебром. При подготовке препаратов для 2D-электрофореза 100 мг измельченного образца гомогенизировали в 2 мл лизирующего раствора (9 М мочевины, 5% меркаптоэтанола, 2% Тритона X-100, 2% амфолинов, рН 3,5–10, система тефлон–стекло). Гомогенат осветляли центрифугированием (5 мин, 800 g), надосадочную фракцию, содержащую экстракт белков, использовали для фракционирования в равных нанесениях по 50–75 мкл.

После трипсинолиза белковые фракции идентифицировали методами MALDI-TOF (опосредованная матрицей времяпролетная лазерная десорбция / ионизация) и MS/MS (тандемная) масс-спектрометрии (масс-спектрометр Ultraflex, «Bruker», Германия) с УФ-лазером ($\lambda = 336$ нм) в режиме детекции положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с их калибровкой по известным пикам автолиза. Для изучения спектра коротких пептидов (с m/z 1500–5000) 100 мг препарата гомогенизировали в 2 мл буфера (5,8 мг KH_2PO_4 ; 232 мг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2,2 г NaCl ; 0,5 мл 10% Тритона X-100; 1,87 г KCl) и дополнительно разводили водой до 50 мл. Гомогенат осветляли центрифугированием (5 мин, 800 g). В надосадочной фракции определяли спектры пептидов. Анализ масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («MatrixScience», США) при точности определения массы $\text{MH}^+ 0,01\%$ с поиском по базам данных NCBI.

Статистическая обработка. Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 14.0 («StatSoft, Inc.», США). Все измерения выполняли в 3 повторностях. Результаты представлены в виде взвешенного среднего (WAM, weighted arithmetic mean) со стандартным отклонением ($\pm\text{SD}$). Статистическую достоверность рассчитывали с применением непараметрических U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) и H-критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis H-test). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждения

Отбор штаммов. Подобранные для микрокапсулирования штаммы являются промышленно ценными стартовыми культурами, разрешенными к применению в мясной промышленности. Протеолитическая активность штаммов и их специфичность воздействия на белки мышечной ткани установлены на основании ранних этапов исследований [14, 15].

На данном этапе для некоторых исследуемых стартовых культур также проведен скрининг генов протеиназ, обуславливающих протеолитическую активность, методом ПЦР (рис. 1).

По результатам ПЦР-скрининга у штаммов *P. acidilactici* 38 и *P. pentosaceus* 28 выявлены протеолитические гены семейства PRTB10/PRTB20 (597 п.н.) и P15C/P06C (560 п.н.), а у штамма *L. acidophilus* AT-45 обнаружены гены семейства Jp23/Jp25 (1034 п.н.) и prt12/PR6Xba (1052 п.н.). Пара генов prt12/PR6Xba (1052 п.н.) также обнаружена у штамма *S. carnosus* 111-2. Полученные результаты подтверждают закономерное присутствие генов протеиназ у штаммов рода *Lactobacillus*. Например, работа Strahinic et al. [16], в которой проводили поиск генов протеиназ у штаммов рода *Lactobacillus*, показала, что у 28 штаммов *Lactoplantibacillus plantarum* и 2 штаммов *Lactoplantibacillus paraplantarum* выявлен широкий спектр генов семейства PrtP/PrtM, позволяющих им гидролизовать β -казеин.

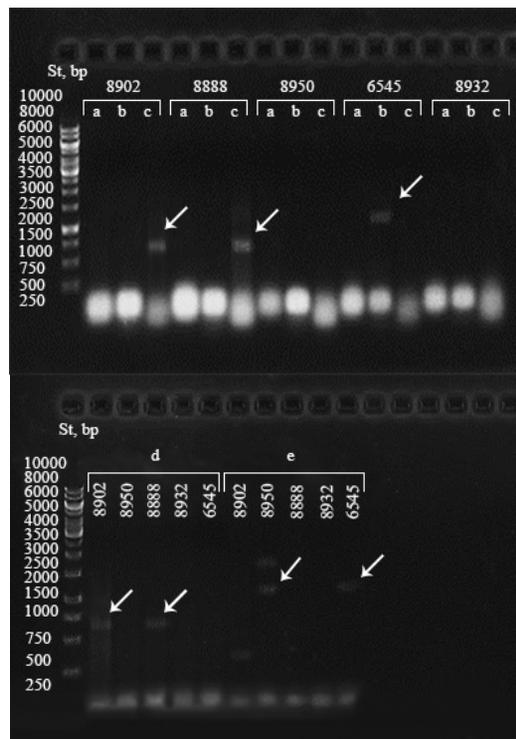


Рис. 1. Результат электрофоретического разделения ПЦР-смеси: 8902 – *Pediococcus acidilactici* 38, 8888 – *Pediococcus pentosaceus* 28, 8950 – *Staphylococcus carnosus* 111-2, 6545 – *Lactobacillus acidophilus* AT-45, 8932 – *Latilactobacillus sakei* 103; *a* – пара генов PrtP700 и PrtM700 (685 н.п.), *b* – пара генов Jp23 и Jp25 (1034 п.н.), *c* – пара генов PRTB10 и PRTB20 (597 п.н.); *d* – пара генов P15C и P06C (560 н.п.), *e* – пара генов prtI2 и IP6Xba (1052 п.н.); St, bp – стандартный маркер GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Стрелками на электрофореграмме указаны соответствующие гены
[Fig. 1. The result of electrophoretic separation of the PCR mixture: 8902 – *Pediococcus acidilactici* 38, 8888 – *Pediococcus pentosaceus* 28, 8950 – *Staphylococcus carnosus* 111-2, 6545 – *Lactobacillus acidophilus* AT-45, 8932 – *Latilactobacillus sakei* 103; *a*, PrtP700 and PrtM700 gene pair (685 bp), *b*, Jp23 and Jp25 gene pair (1034 bp), *c*, PRTB10 and PRTB20 gene pair (597 bp); *d*, P15C and P06C gene pair (560 bp), *e*, prtI2 and IP6Xba gene pair (1052 bp); St, bp – GeneRuler 1kb DNA Ladder standard marker. The arrows on the electrophoregram indicate the corresponding genes]

Также в работах Kojic et al. [17] и Holck et al. [18] обнаружены гены семейства PrtP/PrtM в штаммах *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* BGHN14 и у *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* NCDO 151. Были секвенированы гены, кодирующие протеиназы клеточной стенки, обозначенные как prtB, prtH и prtR из *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCDO 1489, *L. helveticus* CNRZ32 и *L. rhamnosus* BGT10 соответственно, в исследовании Gilbert et al. [19].

Микрокапсулирование. В качестве гелеобразующего компонента для микрокапсулирования использовался природный полисахарид, получаемый преимущественно из бурых водорослей, – альгинат натрия. Микро-

капсулирование осуществлялось диффузионным методом, который подразумевает внесение капель суспензии клеток в растворе альгината натрия в раствор соли кальция. В нашем исследовании использовался 0,1 М раствор хлорида кальция [20]. Концентрация клеток в бактериальной суспензии на основе 0,85%-го раствора хлорида натрия составляла 1×10^{10} КОЕ/мл (по стандарту мутности McFarland). Концентрация альгината натрия подбиралась эмпирическим путем. Для сравнения брали растворы альгината натрия в минимальных рабочих концентрациях – 1, 3 и 5%. Соотношение суспензия: альгинатный гель – 1 : 5. Были сформированы альгинатные капсулы диаметром 1–4 мм с включенными в них стартовыми культурами (рис. 2), а также установлена оптимальная концентрация раствора альгината натрия (табл. 3).

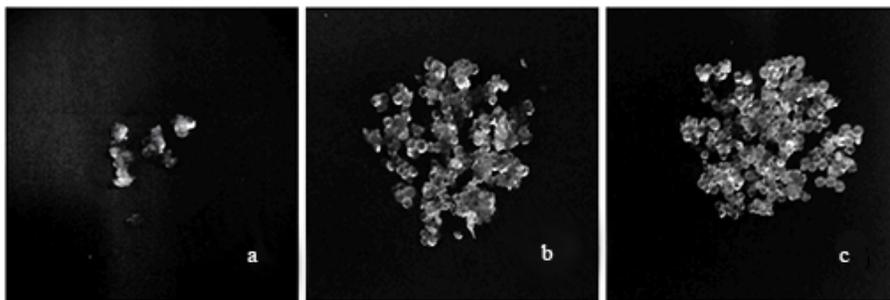


Рис. 2. Изображение микрокапсул с разными концентрациями альгината натрия: *a* – капсулы из 1%-го раствора альгината натрия; *b* – капсулы из 3%-ого раствора альгината натрия; *c* – капсулы из 5%-ого раствора альгината натрия
[Fig. 2. Image of microcapsules with different concentrations of sodium alginate:
a – capsules from 1% sodium alginate solution; *b* – capsules from 3% sodium alginate solution;
c – capsules from 5% sodium alginate solution]

Таблица 3 [Table 3]

Характеристика капсул с различными концентрациями альгината натрия
[Characterization of capsules with different concentrations of sodium alginate]

Концентрация альгината натрия в смеси, % [The concentration of sodium alginate in the mixture, %]	Характеристика полученных капсул [Characteristics of the obtained capsules]
1,0	Капсулы формируются плохо; концентрации альгината недостаточно для формирования капсул; капсулы прозрачные
3,0	Капсулы формируются хорошо; диаметр капсул – 2–4 мм; капсулы сферической формы, но поверхность неоднородная; немного приплюснуты; капсулы молочного цвета
5,0	Капсулы формируются хорошо, диаметр капсул – 1–2 мм, капсулы имеют строго сферическую форму; поверхность однородная; капсулы молочного цвета

По результатам визуального сравнительного анализа наиболее предпочтительным является использование 5%-го раствора альгината натрия, так

как при этом образуются прочные сферические капсулы с включенными в них стартовыми культурами.

При этом несмотря на то, что альгинату натрия свойственно образовывать необратимые гели даже при низких температурах (холодный раствор соли кальция), рекомендуется нагревать раствор соли до 35–40 °С, так как при данных температурных режимах процесс гелеобразования протекает интенсивнее. Следует также отметить, что после двукратной отмывки готовых капсул стерильной дистиллированной водой капсулы могут быть лиофилизированы. Срок хранения таких капсул при –20 °С не более 12 мес.

Chandranouli et al. [21] изучали жизнеспособность *L. acidophilus*, инкапсулированных при различных концентрациях альгината кальция – 0,5; 1,8 и 2% в присутствии желудочного сока (рН 2,0). Наиболее высокие значения выживаемости клеток получены для капсул с 2%-ным раствором альгината кальция – 1×10^6 КОЕ/г, что было определено методом аэробного посева на чашках Петри.

В другом исследовании Özer et al. [22] микрокапсулировали *Lactobacillus acidophilus* в 2% альгинатный гель, использовали при производстве белого сыра методом экструзии и анализировали его в течение 90 дней хранения при температуре 4 °С, получив высокое значение жизнеспособных клеток – 1×10^6 КОЕ/г методом аэробного посева.

Оценка термостабильности капсул. Выработка вареных колбас. На следующем этапе планировалась выработка вареной колбасы с микрокапсулированными стартовыми культурами. Известно, что технология производства вареных колбасных изделий на одном из технологических этапов включает термическую обработку колбасных батонов: 90–95 °С для стадии обжарки и 75–85 °С для стадии варки. При достижении температуры 72 °С в центре батона продукт считается готовым. В обычных условиях такая температура губительна для большинства микроорганизмов: происходит коагуляция белковых компонентов микробной клетки и ее обезвоживание. Так, Todorov et al. в своем исследовании отмечали, что при температуре свыше 50 °С рост молочнокислых бактерий значительно снижается ввиду денатурации белковых компонентов клетки [23, 24]. Тем не менее Pérez-Chabela et al. выделили штаммы *L. plantarum*, *L. curvatus*, *P. pentosaceus* и *P. acidilactici* из вареных колбасных изделий, что подтверждает факт их выживания после тепловой обработки до 70 °С [25]. В их исследовании данные штаммы подвергались нагреванию при температуре 70 °С в течение 60 мин. Жизнеспособность клеток при этом сохранилась.

В результате инкубации чашек с микрокапсулированными штаммами выявлено, что жизнеспособность после термообработки сохранили не все исследуемые штаммы. Так, зафиксировано образование зон просветления в опытных чашках с термообработанными капсулами, содержащими штаммы *P. acidilactici* 38, *P. pentosaceus* 28 и *L. acidophilus* АТ-41 (рис. 3). Из 10 инкубируемых в агаре капсул зоны просветления образовались вокруг 8, 9 и 7-х капсул соответственно (в контрольных чашках зоны просветления образовались вокруг всех 10 капсул). Доля выживаемости составила

70–90%. В опытных чашках с микрокапсулированными штаммами *L. sakei* 105, *L. curvatus* 1, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2 и *S. carnosus* 111-2 возникли зоны просветления вокруг 4, 6, 6, 5 и 3-х капсул соответственно. Доля выживаемости составила 30–60 %.

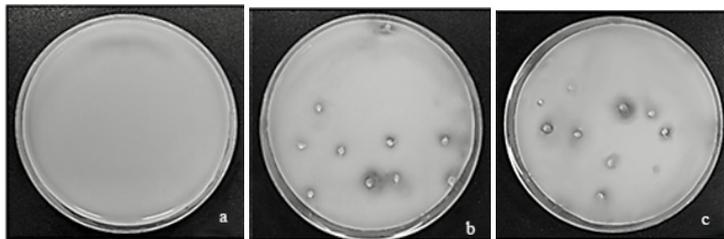


Рис. 3. Картина зон просветления вокруг микрокапсул на меловом агаре: *a* – контрольная чашка с меловым агаром; *b* – чашка с микрокапсулированным штаммом *Lactobacillus acidophilus* AT-41 до термообработки; *c* – чашка с микрокапсулированным штаммом *Lactobacillus acidophilus* AT-41 после термообработки

[Fig. 3. Pattern of clearing zones around microcapsules on chalk agar; *a* - control plate with chalk agar; *b* - plate with microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* AT-41 strain before heat treatment; *c* - plate with microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* AT-41 strain after heat treatment]

Так, в исследовании, проведенном Kim et al. [26], получены положительные результаты для *L. acidophilus* ATCC 43121, инкапсулированных в 2% альгинатный гель капельным методом. При термической обработке и при воздействии в модели желудочно-кишечного тракта *in vitro* капсулы проявляли устойчивость, а внесенные клетки сохраняли свою жизнеспособность. Так, количество клеток после обработки сохранялось на первоначальном уровне – 1×10^6 КОЕ/г (метод аэробного посева). В работе Mona et al. [27] выявлено, что жизнеспособность клеток *L. plantarum*, инкапсулированных в 3%-ных альгинатный гель и прогретых до 65 °С, составляла 1×10^6 КОЕ/г (метод аэробного посева).

Протеомное исследование. Для выработанных в полупроизводственных условиях ФГБОУ ВО «МГУПП» вареных колбас с внесенными в рецептуру микрокапсулированными стартовыми культурами проведено исследование белкового профиля. Первый образец представлял исходный колбасный фарш (Ф), второй – контрольный образец вареной колбасы без добавления стартовых культур (К), а в остальные шесть добавляли капсулированные композиции различных стартовых культур: О1 – образец с композицией из *L. sakei* 105 + *P. pentosaceus* 28 + *S. carnosus* 111-2 (1:1:1), О2 – образец с композицией + *L. acidilactici* (1:1), О3 – образец с культурой *L. acidilactici* AT-41, О4 – образец с культурой *P. pentosaceus* 28, О5 – образец с культурой *L. sakei* 105, О6 – образец с культурой *S. carnosus* 111-2.

При окрашивании геля красителем СВВ R-250 особых отличий в электрофореграмме не выявлено. На рис. 4 представлены ДЭ исходного фарша, контрольного образца вареной колбасы и одного из опытных образцов, обработанного композицией. Отмечается некоторое общее уменьшение

белкового материала по сравнению с исходным фаршем. Часть белков под воздействием микрокапсулированных стартовых культур и термообработки, возможно, переходила в низкомолекулярные компоненты, не детектируемые на 2ДЭ-электро-фореграмме. Результаты идентификации представлены в табл. 4. Согласно полученным данным, фракция № 1 оказалась С-концевым фрагментом мышечной креатинфосфокиназы. В исходном фарше она практически не детектировалась, в контрольной колбасе она явно увеличилась, очевидно, вследствие термических изменений структуры актомиозинового комплекса. В остальных образцах ее количество было сопоставимо с контрольным образцом за исключением образца О4, где количество оказалось минимальным, сопоставимым с исходным фаршем, что могло явиться результатом действия использования соответствующей комбинации стартовых культур именно на креатинфосфокиназу.

Фракции № 2, 18 и 19: № 2 идентифицирована как кофилин 2. Термообработка привела к его уменьшению, но в образцах О3, О5 и О6 его количество сохранилось на уровне исходного фарша. № 18 – фрагменты овотрансферрина куриного яйца и α В кристаллина. Фрагменты кристаллина – стандартный продукт автолиза мышечных тканей и результатов термообработки, а во фракции № 19 обнаружен еще один фрагмент, но другой, мышечной креатинфосфокиназы. В образцах О5 и О6 количество выявленных фракций было больше, чем в фарше и контрольном образце, что показывает специфичность действия этих композиций на конкретные белковые структуры.

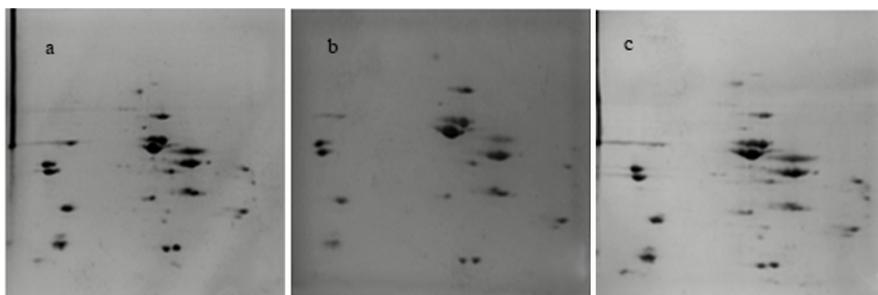


Рис. 4. 2ДЭ-электрофореграммы образцов вареных колбас: *a* – 2ДЭ-электрофореграмма исходного фарша; *b* – 2ДЭ-электрофореграмма контрольного образца; *c* – 2ДЭ-электрофореграмма опытного образца О2. Окрашивание СВВ R-250

[Fig. 4. 2DE electropherograms of boiled sausage samples: *a* – 2DE electropherogram of the original minced meat; *b* – 2DE electropherogram of the control sample; *c* – 2DE electropherogram of the O2 test sample. Staining SVV R-250]

Для фракции № 3 – легкой цепи миозина медленного типа 6В можно отметить нарастание количества после термообработки и обработки стартовыми культурами, кроме образца О3, что, очевидно, обусловлено воздействием на структуры актомиозинового комплекса.

№ 4 – фрагмент ENO1. В контроле (после термообработки) его количество уменьшается примерно вдвое по сравнению с исходным фаршем, но в образцах О1, О2, О4 оно сопоставимо с исходным фаршем, а в образцах

О3, О5, О6 образование этого фрагмента находится на уровне термообработанного контроля.

Фракции № 6–9 идентифицированы как разные изоформы тропонинов I, в основном быстрого типа. В образцах О2, О5 и О6 их количество начинает существенно снижаться, кроме этого, во фракции № 9 начинает детектироваться и фрагмент белка, включающего PDZ домен.

Фракции № 10–11 оказались фрагментами а.п. 71–184 глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Термообработка вела к увеличению количества этих фрагментов, за исключением образцов О5 и О6, где их количество находилось на уровне исходного фарша.

№ 12, 16 – регуляторная легкая цепь миозина 2. Наблюдалось определенное количественное уменьшение при термообработке и особенно выраженное в образце О5. Кроме этого, впервые выявлено фосфорилирование по позиции 16S, ранее документально не доказанное. В образцах О4 и О6 явно увеличилось количество аденилаткиназы 1 (№ 13).

На фоне термообработки также наблюдалось увеличение количества медленного тропонина I (№ 15) и быстрого тропонина Т, которые активно разрушались в образцах О3 и О6.

В целом можно отметить, что культуры, использованные в образцах № О1, О3, О5 и О6, активно взаимодействуют с белками актомиозинового комплекса. А в образце О4 использованная культура в первую очередь затрагивает ферменты энергетического обмена.

Можно предположить, что использование альгинатных микрокапсул несколько замедляет процесс ферментации мясной продукции. Для большего эффекта, очевидно, надо увеличивать вносимую дозу препаратов.

Таблица 4 [Table 4]

Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS / MS) ряда избранных фракций белков из исследованных образцов вареной колбасы

[Results of mass spectrometric identification (MALDI-TOF MS and MS/MS) of a number of selected protein fractions from the studied samples of boiled sausage]

№	Наименование белка (символ гена) [Name of the protein (gene symbol)]	Номера в Protein NCBI или SwissProt [Numbers in Protein NCBI or SwissProt]	S / M/ C	Мм/pI (эксп.) [Мм/pI (exp.)]	Мм/pI (расчет.) [Мм/pI (calc.)]
1	Смесь фрагментов С-концевой части молекулы мышечной креатинфосфокиназы; Creatine kinase M-type (CKM) <i>Bos taurus</i> и <i>Sus scrofa</i>	KCRM_BOVIN	102/9/21	17,0/8,00	43,0/6,63
		KCRM_PIG	102/9/21		43,0/6,61
2	Смесь фрагментов кофилина 2; Cofilin-2 (CFL2) + Acetyl (Protein N-term) <i>Bos Taurus</i> и Cofilin-2 (CFL2) + Acetyl (Protein N-term) <i>Sus scrofa</i>	COF2_BOVIN	70/7/36	17,0/6,40	18,7/7,66
		COF2_PIG	70/7/36		18,7/7,66

№	Наименование белка (символ гена) [Name of the protein (gene symbol)]	Номера в Protein NCBI или SwissProt [Numbers in Protein NCBI or SwissProt]	S / M/ C	Мм/pI (эксп.) [Мм/pI (exp.)]	Мм/pI (расчет.) [Мм/pI (calc.)]
3	Неохарактеризованный белок; Uncharacterized protein (MYL6B) семейства легких цепей миозина <i>Sus scrofa</i>	F1SM01	140/21/72	25,0/5,90	24,0/5,53
4	Фрагмент а.п. 10-434 енолазы 1; Enolase 1 (ENO1) <i>Sus scrofa</i>	A0A287B6S5	267/25/64	45,0/6,00	47,4/6,17
5	Легкая цепь миозина 6; Myosin light polypeptide 6 (MYL6B) <i>Sus scrofa</i>	F1SM01	233/19/85	25,0/5,90	24,0/5,53
6	Быстрый скелетный тропонин I2; Troponin I2, fast skeletal type (TNNI2) <i>Bos taurus</i>	F6QIC1	189/25/56	21,0/9,30	21,0/9,30
7	Быстрый скелетный тропонин I2; Troponin I2, fast skeletal type (TNNI2) <i>Bos taurus</i>	F6QIC1	74/8/30	21,5/8,90	21,0/9,30
8	Тропонин I; Troponin I (TNNI2) <i>Sus scrofa</i>	Q4JH15	281/37/67	21,5/9,35	21,3/9,02
9	Тропонин I; Troponin I (TNNI2) <i>Sus scrofa</i> с примесью фрагмента белка, включающего PDZ домен; PDZ domain-containing protein (PDLIM7) (2) <i>Sus scrofa</i>	Q4JH15 A0A287AZ96	128/22/51 63/3/15	21,5/9,05	21,3/9,02 25,2/9,65
10	Смесь фрагмента а.п. 71-184 глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы; Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2) <i>Sus scrofa</i> и фрагмента а.п. 71-184 Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2) <i>Bos taurus</i>	G3P_PIG G3P_BOVIN	67/4/11 65/4/11	22,5/9,10	35,8,8,51 35,8/8,50
11	Смесь фрагмента а.п. 71-184 глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы; Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2) <i>Sus scrofa</i> и фрагмента а.п. 71-184 Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2) <i>Bos Taurus</i>	G3P_PIG G3P_BOVIN	70/6/17 67/4/11	22,5/9,30	35,8,8,51 35,8/8,50
12	Смесь регуляторной легкой цепи миозина 2; Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYLRF) (1) <i>Bos Taurus</i> и Myosin regulatory light chain 2 (MYLRF) (1) + Phospho (16S) <i>Sus scrofa</i>	A0A452DJW7 Q5XLD2	345/25/89 386/36/88	19,0/4,85	19,0/4,67 19,0/4,90
13	Смесь аденилат киназы; Adenylate kinase isoenzyme 1 (AK1) (1) <i>Sus scrofa</i> и adenylate kinase isoenzyme 1 <i>Bos taurus</i> (AK1) (1)	P00571 P00570	464/34/89 292/26/77	22,0/7,60	21,6/8,38 21,6/8,40

№	Наименование белка (символ гена) [Name of the protein (gene symbol)]	Номера в Protein NCBI или SwissProt [Numbers in Protein NCBI or SwissProt]	S / M/ C	Мм/pI (эксп.) [Мм/pI (exp.)]	Мм/pI (расчет.) [Мм/pI (calc.)]
14	Смесь αВ кристаллина; Alpha-crystallin B chain (CRYAB)+ Acetyl (Protein N-term) <i>Sus scrofa</i> и Alpha-crystallin B chain (CRYAB) + Acetyl (Protein N-term) <i>Bos taurus</i>	CRYAB_PIG	162/16/78	20,0/7,70	20,1/6,76
		CRYAB_BOVIN	141/16/78		20,0/6,76
15	Смесь тропонина II; Troponin II, slow skeletal type (TNNI1) <i>Bos taurus</i> и Тропонин I (TNNI1) <i>Sus scrofa</i>	G3MYN5	115/15/58	22,0/9,30	21,7/9,73
		B3VCE8	129/16/60		21,6/9,61
16	Смесь регуляторной легкой цепи миозина 2; Myosin regulatory light chain 2 (MYLPF) (1) <i>Sus scrofa</i> + Phospho (16S) <i>Sus scrofa</i> и Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYLPF) <i>Bos taurus</i>	Q5XLD2	234/43/95	19,0/4,85	19,0/4,90
		A0A452DJW7	186/34/95		18,9/4,67
17	Смесь тропонина Т быстрых скелетных мышц; Troponin T, fast skeletal muscle (TNNT3) (2) <i>Sus scrofa</i> и фрагмента Тропонин Т, fast skeletal muscle (TNNT3) <i>Bos taurus</i>	Q75NG7	82/14/36	30,0/8,90	30,7/8,69
		A0A3S5ZPW3	90/15/33		40,2/9,34
18	Фрагмент овотрансферрина куриного яйца; Ovotransferrin (TF) (2) <i>Gallus gallus</i> и фрагмент без С-конца αВ кристаллина; Alpha-crystallin B chain (CRYAB)+ Acetyl (Protein N-term) <i>Sus scrofa</i>	TRFE_CHICK	188/30/45	19,0/6,50	80,0/6,85
		CRYAB_PIG	154/17/85		20,0/6,76
19	Смесь фрагментов αВ кристаллина; Alpha-crystallin B chain (CRYAB) <i>Bos Taurus</i> , Alpha-crystallin B chain (CRYAB) <i>Sus scrofa</i> , мышечной креатинфосфокиназы; Creatine kinase M-типе (CKM) (1) <i>Bos Taurus</i> и овотрансферрина; Ovotransferrin (TF) (1) <i>Gallus gallus</i>	CRYAB_BOVIN	265/32/95	19,5/6,50	20,0/6,76
		CRYAB_PIG	251/31/94		20,1/6,76
		KCRM_BOVIN	118/8/32		43,0/6,63
		TRFE_CHICK	119/5/12		80,0/6,85

Заключение

1. Проведен подбор стартовых культур для микрокапсулирования. В качестве исследуемых культур выбраны *L. sakei* 105, *L. acidophilus* AT-41, *L. curvatus* 1, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2, *P. acidilactici* 38, *P. pentosaceus* 28, *S. carnosus* 111-2.

2. Проведено исследование генов протеиназ методом ПЦР. Установлено наличие у штаммов *P. acidilactici* 38 и *P. pentosaceus* 28 протеолитических генов PRTB10/PRTB20 (597 п.н.) и P15C/P06C, а у штамма *L. acidophilus* AT-45 – генов Jp23 /Jp25 (1034 п.н.) и prtI2/IP6Xba (1052 п.н.). У штамма *S. carnosus* 111-2 также детектируются гены семейства prtI2/IP6Xba (1052 п.н.).

3. Осуществлен подбор условий и проведено микрокапсулирование стартовых культур. Микрокапсулирование проводили в растворе 5%-го альгината натрия при 35–40 °С в течение 30 мин.

4. Исследована термостабильность микрокапсул: к нагреву до 72 °С. После тепловой обработки микрокапсулированные штаммы на 30–90 % сохраняли свою активность, что определено по зонам просветления вокруг капсул на меловом агаре за счет нейтрализации кальция молочной кислотой.

5. В полупроизводственных условиях выработаны вареные колбасы с включением в рецептуру микрокапсулированных стартовых культур. Протеомное исследование образцов вареных колбас показало взаимодействие некоторых микрокапсулированных штаммов с белками актомиозинового комплекса. Микрокапсулированный штамм *P. pentosaceus* 28 оказывал существенное воздействие на мышечнотканые ферменты энергетического обмена – мышечную креатинфосфаткиназу, енолазу и аденилаткиназу.

Список источников

1. Liebich VOL.J., Avrutina O., Habermann J., Hillscher L.M., Langhans M., Meckel T., Biesalski M., Kolmar H. Toward fabrication of bioactive papers: covalent immobilization of peptides and proteins. *Biomacromolecules*. 2021. Vol. 22, № 7. PP. 2954–2962. doi: 10.1021/acs.biomac.1c00354
2. Udenigwe C.C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends of Food Science and Technol.* 2014. Vol. 36. PP. 134–143. doi: 10.1016/j.tifs.2014.02.004
3. Venegas-Ortega M., Flores-Gallegos A., Martínez-Hernández J., Aguilar C., Nevárez-Moorillón G. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019. Vol. 18, № 4. PP. 1039–1051. doi: 10.1111/1541-4337.12455
4. Чернуха И.М., Машенцева Н.Г., Вострикова Н.Л., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Афанасьев Д.А. Образование биологически активных пептидов в мясном сыре под влиянием лизатов стартовых бактериальных культур // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. В. 55, № 6. С. 1182–1203. doi: 10.15389/agrobiology.2020.6.1182rus
5. Vukotic G., Mirkovic N., Jovic B., Miljkovic M., Strahinic I., Fira D., Radulovic Z., Kojic M. Proteinase PrtP impairs lactococcal LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501 // *New insights into bacteriocin regulation. Frontiers in Microbiology*. 2015. № 6. P. 92. doi: 10.3389/fmicb.2015.00092
6. Ageyi D., Danquah M. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides // *Biotechnology Advances*. 2011. Vol. 29, № 3. PP. 272–277. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
7. Hu B., Ting Y., Yang X., Tang W., Zeng X., Huang Q. Nanochemoprevention by encapsulation of (-)-epigallocatechin-3-gallate with bioactive peptides/chitosan nanoparticles for enhancement of its bioavailability // *Chemical Communications*. 2012. Vol. 48, № 18. PP. 2421–2423. doi: 10.1039/C2CC17295J
8. Gu Y., Majumder K., Wu J. QSAR-aided *in silico* approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides // *Food Research International*. 2011. Vol. 44, № 8. PP. 2465–2474. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.051
9. Chakrabarti S., Guha S., Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities // *Nutrients*. 2010. Vol. 10, № 11. P. 1738. doi: 10.3390/nu10111738

10. Mahmoud M., Abdallah N., El-Shafeia K., Tawfika N., El-Sayed H. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, № 3. P. e03541. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03541
11. Ji R., Wu J., Zhang J., Wang T., Zhang X., Shao L., Chen D., Wang J. Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology // *Frontiers in Microbiology*. 2019. № 10. PP. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01389
12. De Man J.C., Rogosa M.A., Sharpe E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // *Journal of Applied Microbiology*. 2008. Vol. 23. PP. 130–135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
13. Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Ковалева М.А., Иванов А.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах // *Всё о мясе*. 2013. № 3. С. 32–34.
14. Афанасьев Д.А., Клабукова Д.Л., Машенцева Н.Г., Ахремко А.Г., Куликовский А.В., Чернуха И.М. Влияние стартовых культур на технологические и биохимические показатели сырокопченых колбас // *Мясная индустрия*. 2016. № 12. С. 18–22
15. Афанасьев Д.А., Машенцева Н.Г., Чернуха И.М. Биологически активные пептиды как продукт микробной ферментации мясного сырья и готовых мясных продуктов // *Пищевая промышленность*. 2019. № 4. С. 20–22. doi: 10.24411/0235-2486-2019-10009
16. Strahinic I., Kojic M., Tolinački M., Fira D., Topisirovic L. The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18 // *Letters and Applied Microbiology*. 2010. № 50. PP. 43–49. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02748.x
17. Kojic M., Fire D., Vanina A., Topisirovic L. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14 // *Applied and Environmental Microbiology*. 1991. № 57. PP. 1753–1757. doi: 10.1128/AEM.57.6.1753-1757.1991
18. Holck A., Naes H. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 // *Microbial Genomic*. 1992. № 38. PP. 1353–1364. doi: 10.1099/00221287-138-7-1353
19. Gilbert C., Danielle A., Blanc B., Portailer R., Germond J.E., Lapiere L., Mollet B. A new cell surface proteinase – sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* // *Journal of Bacteriology*. 1996. № 178. PP. 3059–3065. doi: 10.1128/jb.178.11.3059-3065.1996
20. Zhang W.Y., Chen Y.F., Zhao W.J., Kwok L.Y., Zhang H.P. Gene expression of proteolytic system of *Lactobacillus helveticus* H9 during milk fermentation // *Annals of Microbiology*. 2015. Vol. 65, № 2. PP. 1171–1175. doi: 10.1007/s13213-014-0902-3
21. Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P., Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions // *Journal of Microbiological Methods*. 2004. Vol. 56, № 1. PP. 27–35. doi: 10.1016/J.MIMET.2003.09.002
22. Özer B., Kirmaci H., Şenel E., Atamer M., Hayaloglu A.A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation // *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19, № 1. PP. 22–29. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.07.001
23. Cebrián G., Condón S. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics // *Foods*. 2017. Vol. 6, № 12. P. 107. doi: 10.3390/foods6120107
24. Todorov S.D., Stojanovski S., Iliev I., Moncheva P., Nero L.A., Ivanova I.V. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product "lukanka" // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017. Vol. 48, № 3. PP. 576–586. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.005

25. Ramirez-Chavarin N., Wachter C., Carlos E., Pérez-Chabela M.L. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products // *International Food Research Journal*. 2013. Vol. 20, № 2. PP. 991–1000.
26. Kim S.J., Cho S., Kim S., Song O., Shin I., Cha D., Park H. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 // *LWT – Food Science and Technology*. 2008. Vol. 41, № 3. PP. 493–500. doi: 10.1016/j.lwt.2007.03.025
27. Mahmoud M., Abdallah N., El-Shafei K., Tawfik N.F., El-Sayed H.S. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, № 3. PP. E03541. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03541

References

1. Liebich VJ, Avrutina O, Habermann J, Hillscher LM, Langhans M, Meckel T, Biesalski M, Kolmar H. Toward fabrication of bioactive papers: covalent immobilization of peptides and proteins. *Biomacromolecules*. 2021;22(7):2954-2962. doi: 10.1021/acs.biomac.1c00354
2. Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends of Food Science and Technol.* 2014;36:134-143. doi: 10.1016/j.tifs.2014.02.004
3. Venegas-Ortega M, Flores-Gallegos A, Martínez-Hernández J, Aguilar C, Nevárez-Moorillón G. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019;18(4):1039-1051. doi: 10.1111/1541-4337.12455
4. Chernukha IM, Mashentseva NG, Vostrykova NL, Kovalev LI, Kovaleva MA, Afanasev DA. Obrazovaniye biologicheskii aktivnykh peptidov v myasnom syr'ye pod vliyaniyem lizatov startovykh bakterial'nykh kul'tur. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2020;55(6):1182-1203. doi: 10.15389/agrobiology.2020.6.1182rus. In Russian
5. Vukotic G, Mirkovic N, Jovic B, Miljkovic M, Strahinic I, Fira D, Radulovic Z, Kojic M. Proteinase PrtP impairs lactococcal LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: New insights into bacteriocin regulation. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:92. doi: 10.3389/fmicb.2015.00092
6. Agevi D, Danquah M. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. 2011;29(3):272-277. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
7. Hu B, Ting Y, Yang X, Tang W, Zeng X, Huang Q. Nanochemoprevention by encapsulation of (-)-epigallocatechin-3-gallate with bioactive peptides/chitosan nanoparticles for enhancement of its bioavailability. *Chemical Communications*. 2012;48(18):2421-2423. doi: 10.1039/C2CC17295J
8. Gu Y, Majumder K, Wu J. QSAR-aided *in silico* approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides. *Food Research International*. 2011;44(8):2465-2474. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.051
9. Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. *Nutrients*. 2010;10(11):1738. doi: 10.3390/nu10111738
10. Mahmoud M, Abdallah N, El-Shafeia K, Tawfika N, El-Sayed H. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*. 2020;6(3):e03541. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03541.
11. Ji R, Wu J, Zhang J, Wang T, Zhang X, Shao L, Chen D, Wang J. Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:1-10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01389
12. De Man JC, Rogosa MA, Sharpe E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // *Journal of Applied Microbiology*. 2008;23:130-135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
13. Kovalev LI, Shishkin SS, Kovaleva MA, Ivanov AV, Vostrykova NL, Chernukha IM. Proteomnoye izucheniye belkov v obraztsakh svininy i vyrabotannykh iz neye myasnykh produktakh. *Vso o myase*. 2013;3:32-34. In Russian

14. Afanasev DA, Klabukova DL, Mashentseva NG, Ahremko AG, Kulikovskiy AV, Chernukha IM. Vliyaniye startovykh kul'tur na tekhnologicheskkiye i biokhimeskkiye pokazateli syro-kopchenykh kolbas. *Myasnaya industriya*. 2016;12:18-22. In Russian
15. Afanasev DA, Mashentseva IM, Chernukha IM. Biologicheski aktivnyye peptidy kak produkt mikrobnoy fermentatsii myasnogo sy-r'ya i gotovykh myasnykh produktov. *Pishchevaya promyshlennost'*. 2019;4:20-22. doi: 10.24411/0235-2486-2019-10009. In Russian
16. Strahinic I, Kojic M, Tolinacki M, Fira D, Topisirovic L. The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18. *Letters and Applied Microbiology*. 2010;50:43-49. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02748.x
17. Kojic M, Fire D, Banina A, Topisirovic L. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57:1753-1757. doi: 10.1128/AEM.57.6.1753-1757.1991
18. Holck A, Naes H. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *Microbial Genomic*. 1992;38:1353-1364. doi: 10.1099/00221287-138-7-1353
19. Gilbert C, Danielle A, Blanc B, Portailer R, Germond JE, Lapiere L, Mollet B. A new cell surface proteinase – sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*. 1996;178:3059-3065. doi: 10.1128/jb.178.11.3059-3065.1996
20. Zhang WY, Chen YF, Zhao WJ, Kwok LY, Zhang HP. Gene expression of proteolytic system of *Lactobacillus helveticus* H9 during milk fermentation. *Annals of Microbiology*. 2015;65(2):1171–1175. doi: 10.1007/s13213-014-0902-3
21. Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 2004;56(1):27-35. doi: 10.1016/J.MIMET.2003.09.002
22. Özer B, Kirmaci H, Şenel E, Atamer M, Hayaloglu AA. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*. 2009;19(1):22-29. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.07.001
23. Cebrián G, Condón S. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*. 2017;6(12):107. doi: 10.3390/foods6120107
24. Todorov SD, Stojanovski S, Iliev I, Moncheva P, Nero LA, Ivanova IVOL. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product "lukanka". *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017;48(3):576-586. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.005
25. Ramirez-Chavarin N, Wachter C, Carlos E, Pérez-Chabela ML. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *International Food Research Journal*. 2013;20:991-1000.
26. Kim SJ, Cho S, Kim S, Song O, Shin I, Cha D, Park H. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT - Food Science and Technology*. 2008;41(3):493-500. doi: 10.1016/J.LWT.2007.03.025
27. Mahmoud M, Abdallah N, El-Shafei K, Tawfik NF, El-Sayed HS. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*. 2020;6(3):E03541. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03541

Информация об авторах:

Афанасьев Дмитрий Алексеевич – аспирант Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (Москва, Россия).

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

Чернуха Ирина Михайловна – д-р техн. наук, главный научный сотрудник Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (Москва, Россия).

E-mail: imcher@inbox.ru

Ганина Вера Ивановна – д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник Проблемной научно-исследовательской лаборатории «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» Московского государственного университета технологий и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ) (Москва, Россия).

E-mail: vigan5428@yandex.ru

Машенцева Наталья Геннадьевна – д-р техн. наук, профессор кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств (Москва, Россия).

E-mail: natali-mng@yandex.ru

Ковалев Леонид Иванович – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник Федерального исследовательского центра биотехнологии, Института биохимии им. А.Н. Баха РАН (Москва, Россия).

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Коврижных Анна Владиславовна – магистрант кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств (Москва, Россия).

E-mail: anya-1998@mail.ru

Ахангаран Махбубех – аспирант кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств (Москва, Россия).

E-mail: ahangaran@hotmail.com

Гаравири Махмуд – аспирант кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств (Москва, Россия).

E-mail: gharaviri@hotmail.com

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Dmitry A. Afanasev, graduate student, Gorbатов Federal Center for Food Systems RAS (Moscow, Russia).

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

Irina M. Chernukha, Doct. Sci. (Technology), chief researcher, Gorbатов Federal Center for Food Systems RAS (Moscow, Russia).

E-mail: imcher@inbox.ru

Vera I. Ganina, Doct. Sci. (Technology), leading researcher, Razumovsky Moscow State University of Technology and Management (Moscow, Russia).

E-mail: vigan5428@yandex.ru

Natalya G. Mashentseva, Doct. Sci. (Technology), associate professor at the Department of Biotechnology and technology of products of bioorganic synthesis, Moscow State University of Food Production (Moscow, Russia).

E-mail: natali-mng@yandex.ru

Leonid I. Kovalev, Doct. Sci. (Biology), leading researcher, Federal Research Center for Biotechnology, Bakh Institute of Biochemistry RAS (Moscow, Russia).

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Anna V. Kovrizhnykh, master, Department of Biotechnology and technology of products of bioorganic synthesis, Moscow State University of Food Production (Moscow, Russia).

E-mail: anya-1998@mail.ru

Mahboobeh Ahangaran, graduate student, Department of Biotechnology and technology of products of bioorganic synthesis, Moscow State University of Food Production (Moscow, Russia).

E-mail: ahangaran@hotmail.com

Mahmud Gharaviri, graduate student, Department of Biotechnology and technology of products of bioorganic synthesis, Moscow State University of Food Production (Moscow, Russia).

E-mail: gharaviri@hotmail.com

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 21.06.2022;
одобрена после рецензирования 22.12.2022; принята к публикации 29.12.2022.*

*The article was submitted 21.06.2022;
approved after reviewing 22.12.2022; accepted for publication 29.12.2022.*