

(19) C2 (11) 104436 (13) UA

(98) а/с 925, м. Харків, 61082, Україна
(85) 2011-05-08
(74) Шляховецький Олександр Михайлович, (UA)
(45) [2014-02-10]
(43) [2011-06-10]
(24) 2014-02-10
(22) 2009-10-07
(12) Патент України (на 20 р.)
(21) а201105366
(46) 2021-07-14

(86) 2009-10-07 PCT/EP2009/063059
(30) 08166052.4 2008-10-08 EP 61/114,261 2008-11-13 US
(54) ЗБАГАЧЕНИЙ ЗАЛІЗОМ ХАРЧОВИЙ ПРОДУКТ ОБОГАЩЕННИЙ ЖЕЛЕЗОМ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ IRON-FORTIFIED FOOD S
TUFF
(56) US 4689322 A, 25.08.1987 2 WO 2008/028264 A1, 13.03.2008 2 EP 1694312 B1, 07.05.2008 2
(71) ES АБ-БИОТИКС, С.А. ES АБ-БИОТИКС, С.А. ES AB-BIOTICS, S.A.
(72) ES Друдіс Соле Галі ES Друдіс Соле Галі ES Drudis Sole, Galі
(73) ES АБ-БИОТИКС, С.А.

Изобретение касается обогащенного железом пищевого продукта, который содержит источник железа в форме твердых капсул, причем эти капсулы включают сердцевину, содержащую альгинат железа, и внешний слой, содержащий альгинат кальция, и средний размер капсул составляет от 5 мкм до 20 мкм, при этом капсулы могут, но необязательно, образовывать макроскопические агрегаты, которые имеют размер до 1 мм. Капсулы пригодны для обогащения как гидратированных, так и дегидратированных пищевых продуктов и отличаются высокой дисперсионной способностью, а также высокой стабильностью в локальных условиях хранения и использования. Обогащенный железом пищевой продукт в соответствии с изобретением используется с целью предотвращения возникновения дефицита железа или для уменьшения дефицита железа у людей.

Винахід стосується збагаченого залізом харчового продукту, який містить джерело заліза у формі твердих капсул, причому ці капсули включають осердя, яке містить альгінат заліза, та зовнішній шар, який містить альгінат кальцію, і середній розмір капсул становить від 5 мкм до 20 мкм, при цьому капсули можуть, але необов'язково, утворювати макроскопічні агрегати, які мають розмір до 1 мм. Капсули придатні для збагачення як гідратованих, так і дегідратованих харчових продуктів і відрізняються високою дисперсійною здатністю, а також високою стабільністю в локальних умовах зберігання та використання. Збагачений залізом харчовий продукт за винаходом використовується з метою запобігання виникненню дефіциту заліза або для зменшення дефіциту заліза у людей.

It is provided an iron-fortified food stuff comprising an iron source product in form of solid capsules, wherein the capsules comprise a core comprising iron alginate, and an outer layer comprising calcium alginate. The capsules are suitable both for fortifying hydrated and dehydrated food stuff and are characterized by an excellent loading capacity, as well as having a good stability under standard local conditions of storage and use. The iron-fortified food stuff of the invention serves to prevent the occurrence of iron deficiency or to reduce an iron deficiency in a human.

1. Збагачений залізом харчовий продукт, який містить джерело заліза у формі твердих капсул, причому ці капсули включають осердя, яке містить альгінат заліза, та зовнішній шар, який містить альгінат кальцію, і середній розмір капсул становить від 5 мкм до 20 мкм, при цьому капсули можуть, але необов'язково, утворювати макроскопічні агрегати, які мають розмір до 1 мм.
2. Збагачений залізом харчовий продукт за п. 1, який **відрізняється** тим, що осердя додатково містить щонайменше одну біодоступну сіль заліза.
3. Збагачений залізом харчовий продукт за п. 2, який **відрізняється** тим, що щонайменше однією біодоступною сіллю заліза є сахарат заліза (III).
4. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким з пп. 1-3, який являє собою йогурт.
5. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким з пп. 1-3, який являє собою молоко.
6. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким з пп. 1-3, який являє собою напій.
7. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким з пп. 1-3, який являє собою фаршеву емульсію.
8. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким з пп. 1-3, який являє собою ковбасу.
9. Збагачений залізом харчовий продукт за будь-яким із пп. 1-8 для застосування при запобіганні виникненню дефіциту заліза або при зменшенні дефіциту заліза у людини.
10. Спосіб одержання збагаченого залізом харчового продукту, який включає такі стадії:
 - (i) утворення осердя, яке містить альгінат заліза, шляхом розчинення або суспендування щонайменше однієї біодоступної водорозчинної солі заліза у водному розчині щонайменше одного альгінату з одержанням гелю, причому концентрація згаданого щонайменше одного альгінату становить щонайменше 0,6 % (мас.), якщо цей щонайменше один альгінат являє собою альгінат натрію, або еквівалентну концентрацію у випадку іншого водорозчинного альгінату,
 - (ii) повільне додання одержаного гелю у водний розчин солі кальцію з концентрацією, яка становить від 0,025 М, до концентрації нижче точки насичення розчину, при інтенсивному перемішуванні,
 - (iii) відділення одержаних твердих капсул фільтруванням та промивання водою, та
 - (iv) додання одержаного джерела заліза у вигляді твердих капсул у харчовий продукт, причому середній розмір капсул становить від 5 мкм до 20 мкм, і капсули можуть, але необов'язково, утворювати макроскопічні агрегати, які мають розмір до 1 мм.
11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що щонайменше однією біодоступною сіллю заліза є сахарат заліза (III).
12. Спосіб за будь-яким із пп. 10-11, який **відрізняється** тим, що щонайменше один альгінат є альгінатом натрію.
13. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що:
 - (i) утворення осердя, яке містить альгінат заліза, здійснюють шляхом розчинення сахарату заліза (III) у водному розчині альгінату натрію з одержанням гелю, причому концентрація заліза становить 0,5 М, а концентрація альгінату натрію становить 1,5 % (мас.),
 - (ii) одержаний гель повільно додають до водного розчину хлориду кальцію з концентрацією, яка становить 0,5 М, при інтенсивному перемішуванні,
 - (iii) одержані тверді капсули відділяють фільтруванням та промивають водою, та
 - (iv) одержане джерело заліза у вигляді твердих капсул додають у харчовий продукт.
14. Збагачений залізом харчовий продукт, одержаний способом за п. 13.

Перехресне посилання на споріднені заявки

Ця заявка претендує на пріоритет за попередньою заявкою на патент США №61/114,261, що подана 13 листопада 2008 р., та заявкою на Європейський патент EP08166052.4, які включені до цього опису шляхом посилання.

Галузь, якої стосується винахід

Цей винахід стосується збагачених залізом харчових продуктів та їх застосування для попередження виникнення дефіциту заліза або зменшення дефіциту заліза в організмі людини.

Передумови створення винаходу

Дефіцит заліза є одним з найчастіших захворювань, зумовлених недостатністю в їжі певних речовин, яке зустрічається у більшості країн, що розвиваються, а також одним з найчастіших пов'язаних з недостатністю захворювань у промислово розвинутих країнах. Одним із способів компенсації виникнення дефіциту заліза є збагачення залізом деяких харчових продуктів. Однак для забезпечення ефективності зменшення дефіциту заліза за допомогою збагачених ним харчових продуктів додане до них залізо повинне бути достатньою мірою біодоступним.

Придатний для застосування агент, призначений для збагачення залізом, має відповідати низці вимог. По-перше, він має бути нешкідливим для людського організму. Крім того, він має бути нерозчинним у воді у нейтральному або помірно кислотному середовищі, що є вирішальним чинником для забезпечення задовільної здатності до зберігання. Далі, він повинен мати високу здатність до засвоєння в людському організмі, тобто високу біодоступність (що означає високу розчинність у шлунково-кишковому тракті). Він має також мати задовільну стабільність та бути придатним для хімічного визначення та виробництва відтворюваним способом, тобто мати гарантовані постійні та придатні для контролю властивості.

Біодоступність заліза залежить від його хімічної форми, якою визначається його розчинність, а також від присутності компонентів харчових продуктів, які або сприяють, або пригнічують його засвоєння. Біодоступність тісно пов'язана зі змінами сенсорних відчуттів. Джерела заліза, які вільно розчиняються у воді, такі як сульфат заліза (II), глюконат заліза (II), лактат заліза (II) та подвійна сіль цитрат амонію-заліза (III), мають відносно високу біодоступність, проте мають недолік, який полягає у зміні кольору та смаку збагачених продуктів у разі реакції з іншими компонентами харчового продукту. Фумарат заліза (II), сукцинат заліза (II) та сахарат заліза (III) повільно розчиняються у воді, але легко розчиняються у розведених кислотах, наприклад, у шлунковому соку. Хоч вони можуть здаватися більш задовільними, ніж сульфат заліза (II), з точки зору їх впливу на окиснення жирів та колір продукту, їх взаємодія з харчовим продуктом може послабити засвоєння заліза. Відсутність будь-якої взаємодії малорозчинних джерел заліза (наприклад, пірофосфату заліза (III), ортофосфату заліза (III) та елементарного заліза) з харчовими продуктами під час зберігання зумовлює їх привабливість як продуктів для збагачування з комерційної точки зору, і численні продукти дитячого харчування на основі злаків на даний час містять такі форми заліза. Однак біодоступність таких джерел заліза завжди дуже низька.

Таким чином, виявляється, що сполуки заліза, використовувані в промислових масштабах, є або достатньою мірою водорозчинними для спричинення технічних проблем, або настільки малорозчинними, що їх здатність до засвоєння в людському організмі є низькою.

Зроблені кілька спроб створення стабільного біодоступного джерела заліза для збагачення його капсулюванням в інертній сполуці з метою захисту від окиснення та зведення до мінімуму органолептичного впливу. Однак капсулювання кількох солей заліза з застосуванням гідрогенізованої соєвої олії, моно- та диігліцеридів або етилцелюлози, незважаючи на те, що забезпечує певною мірою захист солі заліза, виявилось непридатним для збагачення певних харчових продуктів (див. R.F. Hurrell et al. "Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate", Am. J. Clin. Nutr. 1989, vol. 49, pp. 1274).

У EP-A-1694312 описані частинки моногідрованого сульфату заліза (II) з покриттям з альгінату натрію. Для одержання таких частинок розчин альгінату натрію розбризкують на поверхню твердих частинок сульфату заліза (II) при перемішуванні. На частинки осаджується тонкий шар альгінату, що сприяє утворенню плівки альгінату заліза, яка покриває немодифіковане осердя з сульфату заліза (II). При контакті з водою ці частинки повільно розчиняються, вивільнюючи осердя з сульфату заліза (II) у середовище. Відповідно, ці частинки можуть бути введені у дегідратований харчовий продукт, такий як шпешичні пластівці та інші злакові продукти, однак вони непридатні для збагачення харчових продуктів, які містять воду, наприклад, йогуртів або соків.

Слід вказати також на те, що хелатоутворювальні агенти продемонстрували їх ефективність для підвищення біодоступності солей двохвалентного та трьохвалентного заліза. Перспективним агентом для збагачення залізом вважається комбінація солей заліза та натрію з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA). Зв'язуванню EDTA з залізом сприяє кислотне середовище у шлунку, в той час як у більш лужному середовищі дванадцятипалої кишки відбувається частковий обмін заліза на інші метали. У деяких дослідженнях на основі експериментів на тваринах та людях припускається, що у порожнині кишечника має місце дисоціація заліза з комплексу з EDTA з подальшим поглинанням,

отже, можливим є його транспортування за участю трансклітинного провідного шляху DMT-1, що має високу здатність до регулювання. Відома також інформація, що поєднання заліза з EDTA захищає залізо від впливу інших інгібіторів засвоєння заліза, наприклад, фітатів або поліфенолів. Потенціал цієї комбінації як агента для збагачення залізом підтверджено у п'яти широких випробуваннях по збагаченню, проведених у країнах, що розвиваються (L. Zhu et al. "Iron dissociates from the NaFeEDTA complex prior to or during intestinal absorption in rats", J. Agric. Food Chem. 2006, Vol. 54, 7929-34). Показано, що деякі нижчі органічні кислоти, наприклад, винна, яблучна, бурштинова та фумарова кислоти, забезпечують підвищення біодоступності сполук заліза до 40 разів у дослідженнях in vitro з застосуванням клітин CACO-2 (S. Salovaara et al., "Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2", J. Agric. Food Chem. 2002, Vol. 50, p. 6233). Запропонований механізм впливу кислот аналогічний механізму дії EDTA. Хелатоутворювальний агент зв'язується з катіоном заліза Fe(II) або Fe(III) та запобігає його осадженню під впливом лужного значення pH або будь-якої іншої сполуки, яка захоплює та осаджує залізо. Потім залізо дифундує в ентероцити, де воно може засвоюватися.

Незважаючи на те, що вже відомі численні джерела заліза для збагачення харчових продуктів, існує постійна потреба у агенті для збагачення залізом харчових продуктів, який можна застосовувати в комбінації з гідратованими харчовими продуктами та який має високу механічну міцність і одночасно забезпечує високу біодоступність для людей та високу стабільність збагаченого продукту під час його зберігання.

Короткий опис винаходу

Авторами винаходу віднайдено продукт - джерело біодоступного заліза - з удосконаленими фізичними властивостями, нерозчинний у воді або у слабких кислотних середовищах, внаслідок чого при його доданні до харчового продукту одержаний збагачений залізом харчовий продукт не змінює колір та не набуває неприємного смаку навіть у разі високого вмісту води. У той же час нове джерело заліза має достатню розчинність при pH, типових для шлунка (які у порожньому шлунку можуть знижуватися до 1), і, отже, забезпечує високу біодоступність. Це джерело заліза легко перероблюється, має високу механічну міцність та виготовляється відтворюваним способом.

Таким чином, згідно з одним аспектом цього винаходу пропонується збагачений залізом харчовий продукт, який містить джерело заліза у формі твердих капсул, причому капсули включають осердя, яке містить альгінат заліза, та зовнішній шар, який містить альганат кальцію.

Іншим аспектом цього винаходу є застосування збагаченого залізом харчового продукту за поданим вище визначенням для попередження виникнення дефіциту заліза або для зниження дефіциту заліза в організмі людини.

Детальний опис винаходу

Терміни "біодоступність" та "біодоступний" стосуються ступеня придатності поживної речовини або поживного мікроелементу до поглинання та засвоєння в організмі. Для цілей цього винаходу сіль заліза, використовувана для виготовлення продукту-джерела заліза у формі твердих капсул, застосовуваних у збагаченому залізом харчовому продукті за цим винаходом, повинна мати високу біодоступність, що означає високу розчинність у шлунково-кишковому тракті. Відповідно, терміни "біодоступна сіль заліза", "біодоступна водорозчинна сіль заліза" та "водорозчинна сіль заліза" у значеннях, вживаних в цьому описі, стосуються будь-якої солі заліза, легко розчинної у воді, такої як сульфат заліза (II), глюконат заліза (II), лактат заліза (II) та цитрат амонію-заліза (III), а також солі заліза, яка повільно розчиняється у воді, але легко розчиняється у розведених кислотах, такої як фумарат заліза (II), сукцинат заліза (II) та сахарат заліза (III).

Водорозчинні альгинати, такі як альгинати натрію, калію, магнію або амонію, являють собою природні лінійні полісахариди з бурих морських водоростей, які складаються з двох типів мономерів: залишків β -D-мануранової (M) та α -L-гулуранової (G) кислот, розташованих вздовж ланцюга нерегулярно та у формі блоків. Цей біополімер, який містить карбоксильні групи, здатний утворювати комплекси з іонами багатовалентних металів.

Коли водорозчинна сіль заліза вступає в контакт з водорозчинним альгінатом, відбувається поперечне зшивання та желатинізація карбоксильних груп альгінату внаслідок реакції з катіонами заліза, наприклад, Fe^{2+} або Fe^{3+} .

Виявлено, що коли осердя, яке містить альгінат заліза, вступає у контакт з водним розчином кальцієвої солі, то утворюється капсула (яка складається з осердя, покритого зовнішнім шаром, який містить альгінат кальцію) внаслідок реакції альгінату з катіонами кальцію. Цей зовнішній шар, будучи нерозчинним у воді або у слабких кислотах, запобігає контакту заліза з оточуючим середовищем, водночас підвищуючи механічну міцність капсул. Це джерело заліза у формі твердих капсул є придатним для збагачення залізом гідратованих харчових продуктів.

Загалом, харчовий продукт, призначений для збагачення вищезгаданим джерелом заліза у формі твердих капсул, являє собою продукт харчування або напій, зокрема, продукт харчування або напій, схильний до окиснення, появи неприємного смаку або запаху або зміни кольору у присутності вільного

заліза. Зокрема, згадане джерело заліза може бути використане для збагачення гідратованих харчових продуктів, таких як йогурт, молоко, супи, соуси, соки та інших напоїв, а також звичайних збагачуваних харчових продуктів, таких як порошкоподібні продукти, пшеничні пластівці, та інших злакових продуктів та харчових продуктів, виготовлених з них, таких як хліб, макарони та торти. Додатковими прикладами харчових продуктів, придатних для збагачення за цим винаходом, є м'ясні продукти, такі як ковбаси.

При утворенні осердя в разі, якщо кількість солі заліза більше необхідної для реакції з усією кількістю мономерів альгілату, сіль заліза захоплюється на утвореному гелі. Навпаки, якщо кількість водорозчинного альгілату більше необхідної для реакції з усією наявною кількістю полівалентних катіонів, то водорозчинний альгілат утворює частину одержаного гелю. Відповідно, за одним з варіантів здійснення першого аспекту цього винаходу, осердя додатково містить щонайменше одну біодоступну сіль заліза. За іншим варіантом здійснення того самого аспекту винаходу, осердя додатково містить щонайменше один водорозчинний альгілат, такий як альгілат натрію, калію, магнію або амонію. Відповідно до варіанту, якому віддається перевага, водорозчинним альгілатом є альгілат натрію.

Водорозчинні солі заліза підвищують біодоступність заліза, і з цих міркувань їм віддається перевага. Таким чином, у варіантах, яким віддається перевага, біодоступною сіллю заліза є легко розчинна у воді сіль заліза, така як сульфат заліза (II), глюконат заліза (II), лактат заліза (II) та цитрат амонію-заліза (III), або сіль заліза, повільно розчинна у воді, але легко розчинна у розведених кислотах, така як фумарат заліза (II), сукцинат заліза (II) та сахарат заліза (III). У варіантах, яким віддається перевага, біодоступна сіль заліза вибрана з групи, до якої входять сульфат заліза (II) та сахарат заліза (III). Більша перевага віддається сахарату заліза (III).

Крім того, як згадано вище, ефективними засобами для підвищення біодоступності солей заліза (II) та заліза (III) виявилися хелатоутворювальні агенти.

Відповідно, за одним з варіантів здійснення першого аспекту цього винаходу, осердя додатково містить хелатоутворювальний агент. У варіантах, яким віддається перевага, хелатоутворювальний агент вибирають з групи, до якої входять винна, яблучна, бурштинова, фумарова, лимонна, молочна та щавлева кислоти або їх солі, EDTA та сахароза. У варіантах, яким віддається перевага, хелатоутворювальним агентом є сахароза. Комбінування солі заліза (II) або заліза (III) з хелатоутворювальним агентом для утворення осердя, яке містить альгілат заліза, з зовнішнім шаром, який містить альгілат кальцію за цим винаходом, підвищує біодоступність заліза, одночасно забезпечуючи його відокремлення від оточуючого середовища поза шлунково-кишечним трактом, запобігаючи руйнуванню матриці, яка містить залізо, та виникненню неприємного смаку, пов'язаного з солями заліза, застосовуваними при збагаченні. Як вказано вище, до водорозчинних солей заліза, застосовуваних згідно з цим винаходом, належить сахарат заліза (III), однак, точно кажучи, він являє собою комплекс гідроксиду заліза (III) з сахарозою. Застосування сахарату заліза (III) як солі заліза додає переваги, які досягаються внаслідок присутності сахарози як хелатоутворювального агента.

Вищезгадане джерело заліза виготовляється за нижчезазначеним способом, який включає стадії: (i) утворення осердя, яке містить альгілат заліза, шляхом введення щонайменше однієї біодоступної водорозчинної солі заліза в контакт зі щонайменше одним водорозчинним альгілатом; (ii) введення згаданого осердя в контакт з водним розчином солі кальцію, який має концентрацію в межах від 0,025M до значення, яке лежить нижче від точки насичення розчину; та (iii) відділення одержаних твердих капсул. У варіантах, яким віддається перевага, щонайменше однією біодоступною сіллю заліза, яка застосовується для утворення осердя, є сахарат заліза (III). Крім того, у варіантах, яким віддається перевага, щонайменше одним альгілатом, який застосовується для утворення осердя, є альгілат натрію.

Осердя, яке застосовується для одержання капсули, може бути утворене шляхом осадження щонайменше одного водорозчинного альгілату на поверхню частинок щонайменше однієї солі заліза. Для цієї мети може бути використана будь-яка операція, яка забезпечує осадження плівки альгілату на частинки солі заліза. У варіантах, яким віддається перевага, осадження виконується шляхом розбризкування розчину альгілату за допомогою розпилювальної форсунки на частинки солі заліза, які перемішуються у звичайному устаткуванні для перемішування твердих матеріалів. Для цієї операції доцільно застосовувати пристрої, такі як тарілчасті гранулятори або обертові барабани, які можуть бути обладнані або не обладнані допоміжними лопатками, або пристрої з псевдозрідженим шаром, температура в якому регулюється, де частинки безперервно рухаються вгору та вниз під впливом потоку повітря, який проходить через шар частинок.

У варіантах, яким віддається перевага, джерело заліза виготовляється шляхом (i) утворення осердя шляхом розчинення або суспендування щонайменше однієї біодоступної водорозчинної солі заліза у водному розчині щонайменше одного водорозчинного альгілату для одержання гелю; (ii) повільного додання одержаного гелю при інтенсивному перемішуванні до водного розчину солі кальцію, який має концентрацію в межах від 0,025M до значення, яке лежить нижче від точки насичення розчину; та (iii) відділення одержаних твердих капсул фільтруванням та промиванням

водою.

Коли внутрішнє осердя, яке містить альгінат заліза, утворюється шляхом розчинення або суспендування щонайменше однієї солі заліза у водному розчині щонайменше одного альгінату, то в об'ємі осердя відбувається поперечне зшивання альгінату катіонами заліза, внаслідок чого зменшується розчинність осердя у воді та підвищується його механічна міцність. Для утворення осердя необхідна концентрація альгінату натрію понад 0,6 % (мас.) (або еквівалентна концентрація в разі використання іншого водорозчинного альгінату). Таким чином, у варіантах, яким віддається перевага, щонайменше одним альгінатом є альгінат натрію, і його концентрація у водному розчині становить щонайменше 0,6 % (мас). При нижчих концентраціях утворюються в'язкі розчини, але не тверді капсули. Верхня межа застосовуваної концентрації альгінату визначається його розчинністю у воді та в'язкістю одержуваного розчину альгінату.

Концентрація солі заліза, застосовуваного при виготовленні осердя, може бути вибрана довільно. При нижчих концентраціях заліза утворюються капсули з низьким вмістом заліза, а при вищих концентраціях вміст заліза підвищується. Верхня межа концентрації солі заліза визначається її розчинністю у воді. Цілком задовільні результати були досягнуті при застосуванні солей як заліза (II), так і заліза (III), з концентрацією до 1М. Змішування солі заліза з водним розчином альгінату виконується при інтенсивному перемішуванні для уникнення надмірного підвищення в'язкості одержаної суміші або утворення осаду.

Коли на наступній стадії суміш у формі гелю заліза та альгінату повільно додають до розчину, який містить сіль кальцію, для забезпечення утворення осердя з зовнішнім шаром, який містить альгінат кальцію, утворюються капсули з особливо сприятливою механічною міцністю. Для утворення капсул необхідна мінімальна концентрація кальцію понад 0,025 М. Максимальна концентрація не має вирішального значення за умови, що її значення нижче точки насичення розчину. Фахівцям у галузі легко зрозуміти, що точка насичення розчину, тобто максимальне значення концентрації, залежить від температури рідини, а також від хімічної природи розчиненої речовини.

Концентрацію кальцію при одержанні продукту можна використати для регулювання кінцевої концентрації кальцію у капсулах. При додаванні залізо-альгінатного осердя капсул до розчину солі кальцію можна використовувати молотке устаткування для зменшення розміру капсул. У поданих нижче прикладах для перетворення твердих капсул у піскподібну масу був застосований лабораторний гомогенізатор. На кінцевому етапі капсули відділяють фільтруванням та ретельно промивають водою для видалення вільних катіонів металів.

Джерело заліза за поданим вище визначенням повинно мати досить малий розмір частинок для забезпечення ефективного змішування та запобігання сегрегації при додаванні до харчового продукту, що підлягає збагаченню, а також для забезпечення мінімального органолептичного впливу на готовий збагачений харчовий продукт. Таким чином, розмір капсул за цим винаходом, якому віддається перевага, залежить від харчового продукту, що підлягає збагаченню.

Процес виготовлення джерела заліза, застосовуваного для збагачення гідратованих харчових продуктів, забезпечує регулювання розмірів одержуваних капсул за допомогою використовуваного молоткового устаткування (що тонше подрібнення забезпечує устаткування, то меншими є капсули). У процесі виготовлення можуть утворюватися макроскопічні агрегати капсул, наприклад, агрегати розміром порядку 0,1-1 мм, однак можуть бути одержані утворення значно менших розмірів, які відповідають об'єктам, що складаються з меншої кількості капсул, або окремим капсулам. Таким чином, може виконуватися додаткова класифікація за розмірами капсул шляхом просіювання готового продукту з метою видалення грубих агрегатів. Процес виготовлення капсул забезпечує можливість одержання дуже тонкого порошку з капсулами, що не розрізняються зором. У варіантах, яким віддається перевага, середній розмір частинок джерела заліза, яке може мати форму капсул або дрібних агрегатів капсул, становить від 5 мкм до 20 мкм, однак можуть бути одержані капсули ще меншого розміру.

Капсули, з яких складається джерело заліза, застосовуване для збагачення гідратованих харчових продуктів, характеризуються високою ємністю. Крім того, вони мають високу стабільність у стандартних локальних умовах зберігання та застосування. Отже, вони незначно впливають на зовнішній вигляд, смак та стабільність характеристик збагачених харчових продуктів. Крім того, виявлено, що вони є нешкідливими для людського організму, тобто не є токсичними при пероральному вживанні, а їх цитотоксичність навіть нижча ніж цитотоксичність вільної солі заліза, яку вони містять. Тому ці капсули придатні для збагачення продуктів харчування, оскільки вони стабільні у матриці харчового продукту протягом тривалого часу та здатні вивільнювати водорозчинну сполуку заліза при надходженні у шлунково-кишковий тракт.

Кількість заліза та кальцію у капсулах можна визначити шляхом розчинення капсул та виконання кількісного аналізу методами атомно-абсорбційної спектроскопії. Високий вміст заліза у капсулах уможливорює збагачення харчових продуктів для забезпечення бажаного засвоєння заліза в організмі навіть при введенні незначних кількостей збагачувального продукту.

Джерело заліза, застосовуване для збагачення харчових продуктів, можна додавати як

збагачувальний агент як до дегідратованих харчових продуктів, таких як пшеничні пластівці та інші злакові продукти та вироби, виготовлені з них, такі як хліб, макарони та торти, так і до гідратованих харчових продуктів, таких як йогурт, молоко, супи, ковбаси, соки та інші напої.

Особливо висока механічна міцність капсул у сполученні з нерозчинністю у воді або у слабких кислотних середовищах зумовлює особливу придатність джерела заліза для збагачення харчових продуктів, які зазнають впливу агресивних чинників у процесі виготовлення та/або перебування в агресивних умовах у готовому вигляді, таких як високий вміст води та кислотного середовища, що має місце при збагаченні йогурту.

Можливість введення капсул у харчовий продукт було випробувано з використанням йогурту. Йогурт добре сприймається більшістю груп населення з підвищеною схильністю до дефіциту заліза. Тому збагачення йогуртів може бути ефективним шляхом боротьби з залізодефіцитною анемією. Несприятливі умови, в яких капсули перебувають у йогурті, є показником здатності капсул до захисту оточуючого середовища від присутності розчинного джерела заліза. Однією з проблем у жирних харчових продуктах, збагачених залізом у високих концентраціях, є окиснення жиру та розвиток неприємного смаку. Цей факт не тільки знижує прийнятність харчового продукту для споживача, але також знижує його поживну цінність.

Як описано у поданих нижче прикладах, збагачений йогурт виготовляли з застосуванням джерела заліза у формі капсул за цим винаходом. Залізовмісні капсули додавали до молока, після чого виконували пастеризацію, гомогенізацію та ферментацію шляхом введення ферменту. Результати виконаних випробувань свідчать, що капсули уможливають подолання утруднень, які виникають при збагаченні йогурту (що стосується як процесу виготовлення, так і властивостей самого продукту), оскільки кінцевий продукт як візуально (за відсутністю змін кольору та зовнішнього вигляду), так і органолептично (за відсутністю прогірклого або металевого присмаку) не відрізнявся від незбагаченого йогурту. Крім того, з'ясовано, що одержаний збагачений йогурт, який містить джерело заліза за цим винаходом, виявляє високу стабільність на протязі його зберігання. Отже, у продуктах, у яких капсули перебувають у більш м'яких умовах, слід очікувати більш слабого впливу на їхні характеристики.

Відповідно, за варіантом, якому віддається перевага, збагаченим залізом харчовим продуктом за цим винаходом є йогурт.

За іншим варіантом, якому віддається перевага, збагаченим залізом харчовим продуктом за цим винаходом є молоко.

За ще одним варіантом, якому віддається перевага, збагаченим залізом харчовим продуктом за цим винаходом є напій.

За ще одним варіантом, якому віддається перевага, збагаченим залізом харчовим продуктом за цим винаходом є фаршева емульсія.

За подальшим варіантом, якому віддається перевага, збагаченим залізом харчовим продуктом за цим винаходом є ковбаса.

Крім того, цей винахід охоплює усі можливі комбінації описаних вище конкретних груп продуктів та продуктів, яким віддається перевага.

Якщо не зазначено інше, вказані діапазони значень, діапазони температур, часу, розмірів тощо, слід розглядати як приблизні.

Короткий опис рисунків

На Фіг. 1 показано зміну маси тіла (в грамах) у тварин групи порівняння (В) та тварин, які одержували капсули (С). По осі x відкладено час (днів), а по осі y - масу тіла (г).

На Фіг. 2 показано зміну споживання корму (в грамах на добу та на клітку) тваринами групи порівняння (В) та тваринами, які одержували капсули (С).

На Фіг. 3 показано зміну споживання води (в грамах на добу та на клітку) тваринами групи порівняння (В) та тваринами, які одержували капсули (С).

На Фіг. 4 показано вивільнення заліза (% Fe) у чотирьох різних умовах зберігання, де RT - зберігання при кімнатній температурі, 37C - зберігання при 37 °C, w - зберігання у водному розчині, d - зберігання у відсутності розчинника. По осі x відкладено час у місяцях.

На Фіг. 5 показано вивільнення кальцію (% Ca) у чотирьох різних вищезгаданих умовах зберігання. По осі x відкладено час у місяцях.

На Фіг. 6 показано відношення кількостей катіонів металів (%Fe/%Ca) через півмісяця та через місяць зберігання у чотирьох різних вищезгаданих умовах зберігання.

На Фіг. 7 схематично показано вивільнення металів з приповерхневої області (А) капсул з осердям, яке містить альгінат заліза, та зовнішнім шаром (показаним у розрізі), який містить альгінат кальцію; та (В) частинки, де обидва метали однорідно розподілені у матриці альгінату.

На Фіг. 8 показано періоди годування груддю, розвитку анемії та компенсації анемії за даними випробувань, виконуваних на тваринах при дослідженні біодоступності *in vivo*.

На Фіг. 9 показано збільшення маси тіла у період компенсації анемії. По горизонтальній осі відкладено час (днів), а по вертикальній - масу тіла (г). Групи: М - самці, F - самки, - - негативний

контроль, + - позитивний контроль, с - капсули.

Інші цілі, переваги та елементи новизни цього винаходу частково представлені в описі, а частково будуть очевидними для фахівця у галузі при розгляді опису або можуть бути з'ясовані з практики здійснення винаходу. Подані нижче приклади та фігури наведені для ілюстрації і не призначені для обмеження обсягу цього винаходу.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1. Процес виготовлення залізо-кальцієвих капсул

У розчині 1,5 г альгілату натрію у 100 мл води розчиняли 7,98 г сахарату заліза (III) (приблизно 35 % Fe). За допомогою крапельної лійки суміш альгілату натрію з сахаратом заліза (III) додавали краплями до 300 мл водного розчину 0,5M CaCl_2 . Під час додавання суспензію капсул, що утворювалася, перемішували за допомогою лабораторного гомогенізатора (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). Одержані тверді капсули відділяли фільтруванням під вакуумом. Капсули тричі суспендували у дистильованій воді для видалення розчинних солей і знов фільтрували під вакуумом. Одержано 30 г вологих капсул (Капсула 0).

Той самий процес виконували при використанні як солі заліза або хлориду заліза (III), або гептагідрату сульфату заліза (II) замість сахарату заліза (III). З використанням будь-якої з трьох різних згаданих солей заліза, а також різних концентрацій трьох основних компонентів (тобто солі заліза, альгілату та солі кальцію) були успішно виготовлені перелічені нижче капсули:

Капсула 1: Сахарат заліза (III) (35 % заліза) 1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 2: Сахарат заліза (III) (35 % заліза) 1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 3: Сахарат заліза (III) (35 % заліза) 1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 4: Сахарат заліза (III) (35 % заліза) 1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 5: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 6: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 7: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 8: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 9: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 10: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 11: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 12: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 3,0 %

Капсула 13: FeCl_3 0,1 M, CaCl_2 0,1 M, альгінат натрію 1,5 %

Капсула 14: FeCl_3 0,1 M, CaCl_2 1 M, альгінат натрію 1,5 %

Колір одержаних капсул залежав від використаної солі заліза. Низький ступінь вивільнення катіонів з капсул зумовлює відсутність запаху та придатність до суспендування у воді.

ПРИКЛАД 2. Розмір частинок джерела заліза

З метою оцінювання розміру капсул, одержаних за Прикладом 1 (Капсули 1-14), застосовували оптичний мікроскоп, градуйований для вимірювання довжини. У всіх випадках макроскопічні агрегати капсул були ясно видимі навіть неозброєним оком, а найкраще за допомогою мікроскопа. Незважаючи на те, що ці агрегати мали розміри порядку 0,1-1 мм, можна було спостерігати значно менші об'єкти, які ймовірно могли являти собою агрегати меншої кількості капсул або окремі капсули.

Незначну, ледве видну частку зразку капсул вміщували на мічене предметне скло мікроскопа. До капсул додавали краплю води. Суспензію обережно перемішували за допомогою металевого леза, і на кожне предметне скло клали покривне скло. Кожну пробу спостерігали в оптичному мікроскопі (Nikon Eclipse E800, Nikon Corp., Токіо, Японія) з застосуванням об'єктива 20x та окуляра 10x. У кожній пробі добирали ділянку, де можна було спостерігати або окремі капсули, або найменші кластери капсул. Цю ділянку фотографували, застосовуючи цифрову камеру (Soft Imaging Systems, Colorview.11), приєднану до персонального комп'ютера, який керував аналізатором зображення (analySIS3.0, SoftImaging System Corp., Lakewood Co.). На кожне зображення проектувалася градуйована шкала для калібрування розмірів.

Зареєстровані зображення показали, що розмір капсул та деяких менших агрегатів, як правило, був близьким до 20 мкм, у деяких випадках він зменшувався до 5 мкм і менше. Використовуючи більш грубі молотильні пристрої, можна одержувати капсули більшого розміру, але, як правило, для збагачення харчових продуктів перевага віддається тонкоподрібненим капсулам.

ПРИКЛАД 3. Визначення характеристик капсул

0,3 г вологих капсул розчиняли в концентрованій азотній кислоті у мікрохвильовій печі. Концентрацію заліза та кальцію кількісно визначали, застосовуючи ICP-OES (оптичну емісійну спектроскопію з індуктивно зв'язаною плазмою).

Кількість заліза та кальцію у капсулах майже не залежала від партії аналізованих капсул. За Прикладом 1 було виготовлено дві партії капсул (Капсули 0). Концентрації заліза та кальцію у масових відсотках ($\pm$ стандартне відхилення) у цих двох партіях показано у наведеній нижче Таблиці 1.

Таблиця 1

	Партія 1	Партія 2
%Fe	8,6 ($\pm 0,49$)	7,93 ($\pm 0,071$)
%Ca	0,84 ($\pm 0,021$)	1,23 ($\pm 0,0074$)

В обох партіях не тільки одержано дуже близькі результати, але й спостерігалася висока ємність капсул.

ПРИКЛАД 4. Цитотоксичність капсул

Для перевірки відсутності цитотоксичності капсул за цим винаходом, які містять сіль заліза, використовувалася тест *in vitro*. Тест включав інкубування клітин лінії HELA з речовинами, цитотоксичність яких підлягала випробуванню; цей тест звичайно застосовують для перевірки токсичності. Випробовувані сполуки включали капсули, а також окремо їх основні компоненти: сіль заліза, використану в капсулі (сахарат заліза (PI)), та альгінат натрію. Був виготовлений також негативний контроль, який містив тільки середовище росту HELA, та використовувалася як стандарт росту.

Тестові середовища одержували у стерильних умовах. Капсули, виготовлені за Прикладом 1 (капсули 0; партія 2 Прикладу 3), стерилізували в автоклаві (20 хв, 110 °C). Використовуючи стерильний матеріал, розчиняли 72 мг капсул (капсульне середовище), 17 мг сахарату заліза (Ш) (середовище солі заліза) та 18мг альгіанату натрію (альгінатне середовище) (кожну речовину окремо) у 50 мл ростового середовища HELA. Капсули були нерозчинними і залишалися у стані суспензії. Готували кожне тестове середовище у розведеннях 1:1, 1:10 та 1:100 шляхом розведення поданих нижче кількостей капсульного, альгінатного середовищ та середовища солі заліза свіжовиготовленим ростовим середовищем HELA:

1:1 20 мкл+0 мкл свіжовиготовленого середовища HELA

1:10 2 мкл +18 мкл свіжовиготовленого середовища HELA

1:100 0,2 мкл +19,8 мкл свіжовиготовленого середовища HELA

Розчини 1:1 капсул та солі заліза містили майже одну й ту саму концентрацію заліза (відповідно 0,285 мг/мл та 0,297 мг/мл заліза). Те саме стосується розведень 1:10 та 1:100.

3500 клітин HeLa культивували у 36 лунках двох 96-лункових планшетів: 9 контрольних лунок та 27 для трьох паралельних дослідів з трьома концентраціями для трьох продуктів. У кожну лунку додавали середовище до об'єму 100 мкл. Лунки інкубували при 37 °C протягом 24 год. Додавали у кожну лунку 20 мкл кожного тестового середовища та 80 мкл свіжого середовища. У контрольні лунки додавали тільки 100 мкл свіжого середовища. Один з планшетів інкубували протягом 24 год., а другий - протягом 72 год. Життєздатність клітин вимірювали після 24 та 72 год. інкубування, застосовуючи тест EZ4U на проліферацію нерадіоактивних клітин та цитотоксичність (Biomedica Medizinprodukte GmbH).

Результати були виражені у відсотках росту відносно контролю, тобто у відсотках життєздатності, яку розраховували як кількість живих клітин у будь-якому з тестових розчинів (капсул, сахарату заліза (III) або альгіанату натрію), поділену на кількість живих клітин у негативному контролі та виражену у відсотках. Результати, показані нижче у Таблиці 2, свідчать, що цитотоксичність капсульованого заліза нижче цитотоксичності вільного заліза. Враховуючи, що сахарат заліза (III) є безпечною харчовою домішкою, його капсульована форма також є безпечною. Токсичності альгіанату натрію не виявлено.

Таблиця 2

% життєздатності через 24 год.			
	1:1	1:10	1:100
% життєздатності через 24 год.			
Капсули	82,5 % $\pm$ 2,8	98,7 % $\pm$ 12,4	100,5 % $\pm$ 7,5
Сіль заліза	76,3 % $\pm$ 9,7	101,7 % $\pm$ 8,5	95,7 % $\pm$ 3,2
Альгінат натрію	87,9 % $\pm$ 6,6	85,8 % $\pm$ 6,6	79,9 % $\pm$ 1,7
% життєздатності через 72 години			
	1:1	1:10	1:100
Капсули	65,7 % $\pm$ 8,8	85,2 % $\pm$ 12,7	80,9 % $\pm$ 18,6
Сіль заліза	66,8 % $\pm$ 23,0	62,0 % $\pm$ 15,7	68,7 % $\pm$ 15,3
Альгінат натрію	74,2 % $\pm$ 6,7	91,7 % $\pm$ 16,4	80,2 % $\pm$ 14,7

ПРИКЛАД 5. Гостра токсичність капсул

Для оцінки відсутності токсичності був застосований тест *in vivo* на пацюках при дозі, яка в 100 разів перевищує очікувану дозу для людей. Порівнянню дозою для людей вважали дві третини

значення RDI (рекомендована добова вживана кількість) для людини з масою тіла 70 кг (0,14 мг Fe/кг маси тіла). Тому при дослідженні гострої токсичності на пацюках застосовувалася доза 14 мг Fe/кг маси тіла.

Залізовмісні капсули, використовувані в цьому тесті, виготовляли за Прикладом 1 (капсули 0, партія 2 за Прикладом 3). Оскільки капсули були призначені для споживання живими тваринами, їх виготовляли у стерильних умовах з метою уникнення забруднення капсул патогенними мікроорганізмами.

Застосовані тварини описані нижче:

- Вид та штам: пацюки лінії Sprague-Dawley (SD), Crl:CD, одержані від фірми Charles River Laboratories, Франція.

- Кількість та тип тварин: 12 самок, які не народжували та не вагітніли.

- Вік (під час дослід): 2 тижні.

- Маса тіла (під час дослід): 172-193 г.

- Критерій добору: відхилення маси тіла від середньої не більше $\pm 20\%$ на момент початку дослідження.

- Групи: тварин розподіляли на дві групи (контрольну та дослідну), виходячи з рівномірного розподілу маси тіла у групах.

Застосовували таку часову послідовність дослідження:

- День -5: День надходження тварин у лабораторію. Початок карантину у карантинному приміщенні.

- День -3: Кінець карантину. Початок періоду акліматизації у відповідному приміщенні.

- День 0: Введення розчинів для контрольних дослідів та тестів. Початок дослідження.

- День 14: Кінець дослід. Евтаназія з застосуванням пентобарбіталу та аутопсія.

Пацюків витримували дві доби у карантинному приміщенні, а потім три доби у приміщенні для акліматизації. Стандартні умови утримання: 20-24 °C, відносна вологість (RH) 30-70 %, кратність обміну повітря понад 15 на годину. Температуру та вологість постійно контролювали. Чергували освітлення люмінесцентними лампами протягом 12 год. з 12-годинними періодами темряви. Тварини (по дві у клітці) мали вільний доступ до корму та води (очищеної від кальцію, фільтрованої та опроміненої УФ світлом).

Нижче описано схему введення капсул та контрольних розчинів і виконані спостереження:

Об'єми застосовуваних препаратів. Дозу 2 мл/кг маси тіла вводили одноразово (день 0 дослідження). Контрольна група одержувала лише несуче середовище (дистильовану воду), а тестова група одержувала 87мг/мл суспензії капсул (14 мг заліза/кг маси тіла).

Інтервал введення. Проміжок часу між початком введення препарату першій тварині та закінченням введення останній становив 45 хв.

Смертність та захворюваність. Обидва показники перевіряли протягом дня 0 через 5, 15, 30, 90 хв, 2, 4, 6 та 8 год. після введення, а потім щоденно до дня 14.

Маса тіла. Реєстрували щоденно до дня 3. У день 0 тварин зважували перед введенням препаратів.

Споживання корму та води. Реєстрували тричі на тиждень (у понеділок, середу та п'ятницю), починаючи з дня 3.

Клінічні симптоми. Контролювали через 5, 15, 30, 90 хв, 2, 4, 6 та 8 год. після введення та щоденно протягом 13 подальших днів.

Усі методики, застосовувані у цьому дослідженні, ґрунтуються на вказаних нижче та суворо додержуваних законодавчих актах: Директиві Європейської Комісії 2003/63/ЄС від 25 червня 2003 р., яка змінює директиву 2001/83/ЄС, що стосується медичних продуктів для використання людьми. Методики та пристрої точно відповідають вимогам захисту тварин, використовуваних при експериментах, які містяться у таких документах:

- Директива Європейської Комісії 2003/63/ЄС

- Європейська Директива 89/609/ЄЕС

- Іспанський Королівський Декрет Real Decreto 1201 /2005

- Рекомендації FELASA

- Документ Організації економічного співробітництва і розвитку (OECD) - ENV/JM/MONO (2000)7

Вищезазначені параметри перевіряли для кожного пацюка, і контрольна та тестова групи порівнювалися з застосуванням тесту Ст'юдента з $\alpha < 0,05$ (в разі його придатності). Спонтанна смертність не спостерігалася у жодної тварини. В жодному випадку на протязі 14 днів періоду спостереження не спостерігалися значущі клінічні ознаки, які вказували б на необхідність умертвлення тварини з експериментальною метою. Не спостерігалися значущі відмінності ні маси тіла (дивись нижче Таблицю 3, де наведені середні значення результатів, одержаних для 6 тварин, Фіг. 1), ні споживання корму та води (дивись нижче таблицю 4, де подані середні значення результатів, одержаних для 3 груп тварин (3 кліток), відповідно Фіг. 2 та 3) між тестовими та контрольними групами тварин. Значення у дужках характеризують стандартне відхилення. Результати посмертного

мікроскопічного дослідження для тестових та контрольних груп аналогічні.

Таблиця 3

Зміни маси тіла (г) для тварин контрольної групи (контроль)
та тварин, які одержували капсули (капсули)

	Контроль	Капсули
День	Середнє (г)	Середнє (г)
-3	166,8 (5,3)	165,1 (7,8)
-2	173,9 (6,3)	172,1 (6,9)
-1	177,1 (5,7)	173,1 (7,5)
0	184,2 (5,2)	181,9 (7,8)
1	181,7 (4,4)	182,1 (6,8)
2	184,3 (4,5)	183,1 (4,5)
3	189,2 (4,5)	190,4 (7,9)
4	193,5 (5,5)	191,0 (7,5)
7	204,0 (5,6)	204,4 (7,9)
8	209,9 (2,1)	203,8 (10,2)
9	211,1 (4,3)	209,1 (5,7)
10	209,5 (4,2)	210,7 (8,4)
11	215,3 (4,9)	216,3 (7,4)
	Контроль	Капсули
12	224,3 (4,4)	221,3 (7,3)
13	224,7 (4,9)	222,0 (9,9)
14	224,9 (5,9)	223,4 (8,0)

Таблиця 4

Зміни споживання корму (г/добу/клітку) для тварин контрольної групи
(контроль) та тварин, які одержували капсули (капсули)

	Контроль	Капсули
День	Середнє (г)	Середнє (г)
-3	38,3 (2,9)	38,7 (2,6)
0	34,1 (3,0)	33,8 (0,4)
2	35,3 (5,2)	36,9 (2,9)
4	36,5 (1,1)	38,2 (0,2)
7	35,8 (2,2)	35 (2,0)
9	38,3 (6,4)	40,05 (4,6)
11	40,5 (0,8)	39,2 (1,6)

Таблиця 5

Зміни споживання води (г/добу/клітку) для тварин контрольної групи
(контроль) та тварин, які одержували капсули (капсули)

	Контроль	Капсули
День	Середнє (г)	Середнє (г)
-3	59,7 (16,8)	48,9 (1,2)
0	53,2 (2,9)	50,8 (2,5)
2	61,9 (9,8)	48,6 (7)
4	58,5 (8,4)	73,4 (9,3)
7	56,2 (25,3)	98 (42,9)
9	83,1 (29,6)	58,6 (1,3)
11	62,6 (9,1)	48,9 (1,2)

З вищезгаданих результатів можна зробити висновок, що відсутність смертності або значущих клінічних симптомів свідчить, що випробувані продукти не спричиняють гострої токсичності та є нетоксичними при пероральному введенні самкам пацюків лінії Sprague-Dawley у віці 8 тижнів у дозі,

еквівалентній кількості заліза 14 мг/кг маси тіла.

ПРИКЛАД 6. Стабільність капсул

Випробовували здатність капсул запобігати вивільненню корисного компонента під час зберігання у різних умовах, аналогічних тим, які відповідають різним середовищам, до яких додають капсули. Капсули поділяли на чотири групи, і кожну групу піддавали впливу різних умов:

1. Зберігання при кімнатній температурі (RT) у водному розчині.
2. Зберігання твердих капсул при кімнатній температурі.
3. Зберігання при 37 °C у водному розчині.
4. Зберігання твердих капсул при 37 °C.

Два різних варіанти умов зберігання стосовно до присутності води були вибрані для моделювання двох крайніх випадків середовищ, у яких можуть опинитися капсули: рідких харчових продуктів або продуктів з високим вмістом води та сухих харчових продуктів або продуктів з низьким вмістом води. Оскільки харчові продукти або домішки до харчових продуктів звичайно зберігаються при кімнатній температурі або нижче від неї, та оскільки агресивність середовища підвищується при підвищенні температури, експерименти виконували при кімнатній температурі. Також була вибрана дещо вища температура з метою екстраполяції одержаних результатів на більш тривалі періоди зберігання при нижчій температурі та моделювання поведінки капсул у більш жорстких умовах у порівнянні з імовірними умовами, впливу яких вони можуть зазнати.

Використовували капсули, виготовлені за Прикладом 1 (капсули 0; партія 2 Прикладу 3) із пластмасових або скляних матеріалів, застосовуваних при експериментах, видаляли слідові кількості заліза шляхом витримування протягом ночі у 10 % (за об'ємом) розчині концентрованої хлороводневої кислоти або азотної кислоти та 5-6-разового ополіскування великими кількостями води кваліфікації mili-Q. Дві проби та контрольну пробу для кожного аналізу виготовляли у стерильних умовах шляхом відважування приблизно 120 мг капсул (за винятком контрольної проби) та додання 15 мл дистильованої води (за винятком експериментів з твердими капсулами). Кожну пробу витримували у щільно закритому контейнері при кімнатній температурі або при 37 °C протягом 0, 0,5 або 1 місяця. Через 0, 0,5 або 1 місяць до проб "твердих капсул" додавали 15 мл дистильованої води. Потім усі проби фільтрували для видалення твердого матеріалу, і в надосадовій рідині кількісно визначали вивільнені залізо та кальцій методом ICP-AOS.

Вивільнення заліза та кальцію з капсул використовували як показник стабільності капсул. Що меншою є кількість вивільненого заліза, то кращою є здатність капсул зберігати всередині корисний компонент та захищати як середовище від деградації під впливом заліза, так і залізо від захоплення середовищем. Характеристики вивільнення заліза (середні значення для двох проб) у чотирьох різних умовах зберігання показані нижче у Таблиці 6 (дивись також Фіг. 4). Значення у дужках означають стандартне відхилення.

Таблиця 6

Вивільнення заліза

Місяці	% вивільненого Fe			
	37C, w	RT, w	37C, d	RT, d
0,0	0,199 (0,161)	0,199 (0,161)	0,199 (0,161)	0,199 (0,161)
0,5	1,280 (0,056)	0,775 (0,026)	0,183 (0,058)	<0,017
1,0	1,388 (0,081)	0,541 (0,005)	0,284 (0,038)	0,037 (0,011)
2,0	1,352 (0,177)	0,967 ()	0,242 (0,002)	0,029 ()
3,0	1,271 (0,005)	-	0,252 (0,068)	-
6,0	-	0,288 ()	-	0,050 ()
12,0	-	0,337 (0,134)	-	0,376 (0,062)

RT - зберігання при кімнатній температурі, 37C - зберігання при 37 °C, w - зберігання у водному розчині, d - зберігання у відсутності розчинника.

Вищезгадані значення показника вивільнення заліза з капсул свідчать про дуже високу стабільність капсул. У найжорсткіших умовах вивільнюється лише менше ніж 1,4 % капсульованого заліза. Порівняння швидкості вивільнення у різних умовах показує, як впливають на стабільність капсул присутність води та температура зберігання. Тенденція чітко вирізняється при порівнянні чотирьох груп зразків. Підвищення температури (37 °C замість кімнатної температури - приблизно 20-25 °C) збільшує швидкість вивільнення, як і збільшення часу контакту капсул з водою. Із згаданих результатів видно також, що вплив додання води до капсул або витримування їх у середовищі з високою активністю води сильніше впливає на швидкість вивільнення заліза, ніж підвищення температури від кімнатної до 37 °C. Сприятливі значення швидкості вивільнення, досягнуті при

втримуванні капсул у водному розчині та при 37 °С, ще поліпшуються при зниженні температури до більш реальних значень. При кімнатній температурі максимальна швидкість вивільнення після першого місяця становить лише 0,5410 %±0,0050. Характеристика капсул наближається до оптимальної, якщо вони зберігаються також при кімнатній температурі, але в середовищі з низькою активністю води: на протязі перших двох тижнів вивільнення заліза не виявлено (вивільнення нижче від 0,017 %), а після зберігання протягом одного місяця у середовищі було вивільнено 0,037 %±0,011 корисного компонента.

Результати щодо кількості вивільненого кальцію дещо відмінні, як видно з поданої нижче Таблиці 7 (дивись також Фіг. 5). Значення у дужках означають стандартне відхилення.

Таблиця 7

Вивільнення кальцію

Місяці	% вивільненого Са			
	37C, w	RT, w	37C, d	RT, d
0,0	10,264 (8,308)	10,264 (8,308)	10,264 (8,308)	10,264 (8,308)
0,5	29,595 (5,152)	22,692 (0,752)	16,158 (1,411)	13,711 (0,853)
1,0	35,228 (2,593)	23,148 (3,389)	18,001 (1,027)	17,198 (3,238)
2,0	38,421 (1,944)	40,825 ()	17,305 (0,278)	20,683 ()
3,0	39,760 (0,004)	-	19,661 (2,740)	-
6,0	-	23,532 ()	-	13,965 ()
12,0	-	23,738 (3,811)	-	25,67 (1,939)

RT - зберігання при кімнатній температурі, 37C - зберігання при 37 °С, w - зберігання у водному розчині, d - зберігання у відсутності розчинника.

Частка вивільненого у середовище кальцію більш ніж у 10 разів більше частки заліза; це свідчить, що капсули здатні значно краще утримувати всередині залізо, ніж кальцій. Вивільнення кальцію вказує, що найімовірніше капсули з часом розкладаються, але, оскільки кальцій легше доступний, ніж залізо, то кальцій першим вивільнюється у середовище. Якщо б при виготовленні капсул використовувалося тільки залізо, то у середовище вивільнювалося б залізо, а не кальцій.

ПРИКЛАД 7. Структура капсул

Виготовлення капсул з застосуванням катіонів двох різних металів - заліза та кальцію - було вибране з метою забезпечення капсул додатковим захисним шаром, окрім того, який забезпечує альгінатний полімер. Послідовність додавання катіонів металів у процесі виготовлення капсул також добрана специфічно з метою сприяння утворенню внутрішнього осердя, яке містить альгінат заліза (тобто збагачене залізом), та зовнішнього шару, який містить альгінат кальцію (тобто збагачений кальцієм). Як наслідок, в разі руйнування капсул під час зберігання або маніпуляцій, області, збагачені кальцієм, вивільнюються в оточуюче середовище, при цьому вивільнення заліза з осердя, яке містить альгінат заліза, уповільнюється.

Як видно з даних, одержаних при дослідженні стабільності капсул, у всіх умовах випробування частка вивільненого кальцію значно перевищує частку заліза (Таблиця 6, Таблиця 7 та Фіг. 6). Цей факт повністю узгоджується з запропонованою структурою капсули, яка включає внутрішнє осердя, яке містить альгінат заліза, та зовнішній шар, який містить альгінат кальцію. Вивільнення металів з капсули обумовлене хімічною солюбілізацією її компонентів або фізичним стиранням капсули. В обох випадках першим вивільнюється компонент, який міститься у приповерхневій області. Оскільки капсули більшою мірою збагачені залізом, ніж кальцієм (7,93 % Fe проти 1,23 % Ca), більша частка кальцію має міститися близько до поверхні капсули, тоді як більша частка заліза має міститися далі від поверхні, як показано на Фіг. 7 (А). Якщо розподіл обох металів мав би бути цілком однорідним, як уявно показано на Фіг. 7 (В), то слід було б очікувати відношення вивільнених заліза та кальцію, дуже близького або рівного до відношення вмісту металів у капсулі, а відношення вивільнених кількостей %Fe/%Ca було б близьким до 1. Практично визначене відношення більш ніж у 23 рази менше від відношення, передбачуваного цією моделлю. Таким чином, цей факт підтверджує шарувату структуру капсул, які включають внутрішню область, збагачену залізом, та зовнішню оболонку, збагачену кальцієм.

ПРИКЛАД 8. Випробування біодоступності та розчинності

Поглинання Fe має місце у шлунково-кишковому тракті. Значення рН у шлунку варіює на протязі доби залежно від кількості їжі, яка в ньому міститься. Загалом, воно є кислотним. При порожньому шлунку рН може знижуватися до 1, а після повноцінного прийому їжі підвищується до приблизно 5.

Оскільки повний тест на біодоступність на людях є дуже складним та вимагає тривалого часу, біодоступність джерела заліза за цим винаходом спочатку оцінювали із застосуванням як показника

порівняння значення розчинності у штучному середовищі шлунка.

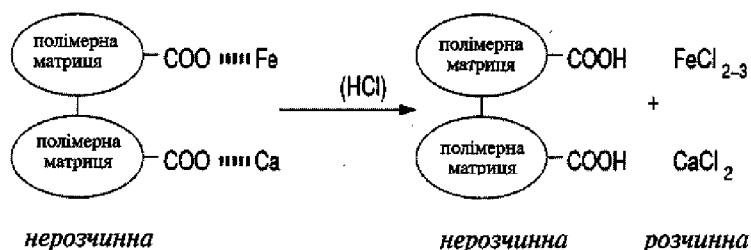
Біодоступність залізовмісних капсул залежить від їх здатності вивільнювати корисний компонент. Якщо капсули є настільки стабільними, що вони витримують середовище шлунково-кишкового тракту без вивільнення їх вмісту, то біодоступність заліза буде близькою до нуля, оскільки капсули надто великі для їх поглинання у кишечнику. З іншого боку, якщо капсули втрачають свою стабільність в процесі проходження через шлунково-кишковий тракт, то корисний компонент буде вивільнюватися у формі розчинної солі заліза, яка буде поглинатися в кишечнику, забезпечуючи високу біодоступність капсульованого заліза. Експеримент *in vitro*, виконуваний з метою оцінювання вивільнення корисного компонента в процесі кислотного розщеплення, спрямований на визначення вивільнення заліза з капсул після вилугування хлористоводневою кислотою при $\text{pH}=2$, близькому до pH у шлунку.

У пробірку Еппендорфа місткістю 10 мл відважували 10 мг капсул сахарату заліза (III), виготовлених за Прикладом 1 (Капсули 1), а потім додавали 9 мл води. Пробірку енергійно струшували вручну для суспендування капсул. Більшість капсул легко суспендувалася, однак деяка кількість грубих агрегатів капсул залишалася на дні пробірки. Краплю суспензії вміщували на предметне скло мікроскопа для спостереження. Капсули, а також грубі агрегати, було видно при збільшенні 100х (Olympus CH-2, окуляр 10х, об'єктив 10х). Додавали у пробірку Еппендорфа 1 мл 0,1 М розчину HCl у воді та енергійно стушували. Другу краплю кислої суспензії також вміщували на предметне скло та порівнювали з першою. Значних відмінностей між краплями не виявлено. Після 30 хв кислотного розщеплення краплю з капсулами вміщували на предметне скло мікроскопа. Перед спостереженням у мікроскопі вводили в контакт з першою краплею краплю 1М розчин NaOH і спостерігали під мікроскопом суміш крапель. При дифузії NaOH через суспензію капсул розчинення капсул відбувалося майже миттєво.

Незначну пробу свіжих капсул вміщували на чисте предметне скло мікроскопа. Поверх капсул вміщували краплю 1М NaOH . У структурі капсул не виявлено жодних змін, і капсули залишалися стабільними протягом усього періоду спостереження (доки крапля випаровувалася, залишаючи осад NaOH з захопленими капсулами).

Експеримент з вивільнення складався з двох етапів. На першому етапі капсули суспендували у кислотному середовищі при pH приблизно 2. Це значення pH близьке до pH , виявленого у шлунку. У цих умовах видимих змін у структурі капсул не виявлено, як свідчать два мікрознімки, зроблені при збільшенні 100х.

Ця відсутність змін при суспендуванні капсул у дистильованій воді або в 0,01М HCl не є несподіваною, якщо взяти до уваги хімічні речовини, очікувані у цих розчинах. У дистильованій воді капсули стабільні і утворюють осад альгінату заліза та альгінату кальцію. Залізо та кальцій сильно взаємодіють з альгіном внаслідок присутності карбоксилатних груп ($-\text{COO}^-$) у полімерному альгінаті. При підкисленні суспензії до значення pK_a , нижчого від pK_a альгінової кислоти ($\text{pK}_a > 4$), карбоксилатні групи ($-\text{COO}^-$) перетворюються у карбоксильні групи ($-\text{COOH}$), які значно слабше взаємодіють з катіонами. Це є вирішальною стадією, результатом якої є вивільнення корисного компонента з капсул. В той час як непротонована форма альгінатів ($-\text{COO}^-$) помітно розчиняється у воді, протонована форма є нерозчинною. Цим пояснюється відсутність видимих змін, оскільки полімерна матриця залишається нерозчинною, однак хімічно змінюється, як видно з поданої нижче схеми реакції:



Після перетворення альгінату в альгінову кислоту вивільнення металів вимірюється опосередковано шляхом розчинення альгінової кислоти у лужному середовищі. Якщо катіони вивільнюються, то залишком є розчинні хлориди заліза та кальцію і нерозчинна альгінова кислота. При підлугуванні середовища, наприклад, 1М розчином NaOH , осад альгінової кислоти розчиняється. Швидке розчинення пояснюється зворотним перетворенням альгінової кислоти в альгінат натрію. Залізо та кальцій присутні у надто низьких концентраціях для утворення осаду з альгіном натрію, який у формі альгінату є розчинним.

З іншого боку, якщо катіони ще залишаються зв'язаними з альгінатною матрицею, то при підлугуванні альгінова кислота знову перетворювалася б в альгінат, який не розчиняється, будучи зв'язаним з залізом та кальцієм. Таким чином, при підлугуванні нерозщеплені капсули мають

залишатися незмінними, оскільки карбоксильні групи, присутні у капсулах, уже знаходяться у формі карбоксилату ($-\text{COO}^-$) та сильно взаємодіють з обома катіонами - заліза та кальцію. Незначна частка нерозщеплених капсул, суспендованих в 1М NaOH, що також фотографували під мікроскопом, зберігає свій вигляд незмінним з часом, що, як очікується, означає стабільність нерозщеплених капсул при витримуванні в 1М NaOH.

Непряме вивільнення металів, яке спостерігається в цьому експерименті, вказує, що після надходження до шлунка нерозчинні капсули в умовах кислотного середовища перетворюються у нерозчинну альгінову кислоту та розчинні солі заліза та кальцію. Оскільки розчинні солі заліза мають високу біодоступність, то очікувана біодоступність цих капсул є також високою. Тому ці капсули придатні для збагачення харчових продуктів, оскільки вони зберігають стабільність у середовищі харчових продуктів протягом тривалого часу та здатні вивільнювати метали при надходженні до шлунково-кишкового тракту.

ПРИКЛАД 9. Біодоступність - випробування in vivo

Метою цього дослідження біодоступності є порівняння біодоступності мікрокапсульованого заліза та сульфату заліза (II). Сульфат заліза (II) був вибраний як позитивний контроль, оскільки він не тільки звичайно використовується як стандарт у дослідженнях біодоступності заліза, але й має високу біодоступність.

Дослідження було спрямоване на вимірювання здатності анемічних пацюків до відновлення вмісту заліза з використанням різних джерел заліза:

- Негативна контрольна група: базовий корм з низьким вмістом заліза без домішки заліза;
- Позитивна контрольна група: базовий корм з низьким вмістом заліза, збагачений 10 млн^{-1} заліза з розчинного сульфату заліза (II);
- Дослідна група: базовий корм з низьким вмістом заліза, збагачений 10 млн^{-1} заліза з залізовмісних мікрокапсул (капсульованого сахарату заліза (III)).

Ці три рецептури кормів були вибрані на основі рекомендацій AIN-93G щодо корму для експериментальних гризунів без домішки заліза (вказаний вміст $2\text{-}6 \text{ млн}^{-1} \text{ Fe}$). Базовий корм був застосований як негативний контроль. Корм, що використовувався як позитивний контроль, був виготовлений шляхом доповнення базового корму $10 \text{ млн}^{-1} \text{ Fe}$ з застосуванням $50 \text{ мг/кг FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Тестовий корм був виготовлений шляхом доповнення базового корму $10 \text{ млн}^{-1} \text{ Fe}$ з застосуванням 125 мг/кг мікрокапсульованого заліза ($7,93 \%$ (мас.) Fe у мікрокапсулах у формі сахарату заліза (III)). На протязі дослідження тварини мали вільний доступ до корму та деіонізованої води.

До дослідження було залучено 40 пацюків лінії Sprague Dawley (20 самців, 20 самок) з 4 різних приплодів. Годування материнським молоком припиняли у віці 21 дня (день 0, початок дослідження), і тварин розподіляли по клітках з нержавіючої сталі за випадковою схемою. У кожную клітку вміщували по дві тварини однакової статі. Тварин утримували у контрольованому оточуючому середовищі ($20\text{-}22^\circ \text{C}$, відносна вологість (RH) $30\text{-}50 \%$, час освітлення: $08:00\text{-}20:00 \text{ год.}$).

Анемію провокували у трьох груп тварин, яких годували базовим кормом без заліза протягом перших 22 днів (самок) або 23 днів (самців) дослідження, як показано на Фіг. 8. Після періоду індукування анемії режим харчування було змінено, як вказано нижче:

- Група негативного контролю: 3 клітки з самцями та 3 клітки з самками (6+6 тварин). Ця група продовжувала одержувати базовий корм без домішки заліза.
- Група позитивного контролю: 3 клітки з самцями та 3 клітки з самками (6+6 тварин). Ця група одержувала базовий корм, збагачений 10 млн^{-1} заліза з розчинного сульфату заліза (II).
- Дослідна група: 4 клітки з самцями та 4 клітки з самками (8+8 тварин). Ця група одержувала базовий корм, збагачений 10 млн^{-1} заліза з залізовмісних мікрокапсул (капсульованого сахарату заліза (III)).

Тварин витримували для компенсації анемії протягом 2 тижнів (14 днів). По збіганні цього періоду тварин анестезували шляхом інгаляції ізофлурану (індукційна доза 3% , підтримуюча доза $1,5\text{-}2 \%$) та умиряли відбиранням крові шляхом внутрішньосерцевої пункції. На протязі дослідження тварин періодично зважували. Вимірювали також кількість спожитого корму.

Зміни маси тіла на протязі періоду компенсації представлені у Таблиці 8 та Таблиці 9 (дивись також Фіг. 9).

Таблиця 8. Зміни маси тіла самців, обчислені як $\text{маса}(\text{день}_n) - \text{маса}(\text{день}_0)$. Період компенсації анемії почався з дня 22 (дивись також Фіг. 9)

Таблиця 8

День	Негативний контроль x (SD)	Позитивний контроль x (SD)	Дослідна група x (SD)
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4	11,9 (4,1)	13,5 (1,3)	13,1 (3,1)

7	25,7 (1,9)	25,4 (1,7)	27,3 (2,7)
11	44,8 (3,9)	44,3 (3,4)	47,3 (4,6)
14	58,0 (6,4)	57,3 (5,3)	63,5 (4,6)
16	65,7 (6,4)	65,7 (5,5)	72,4 (5,0)
18	70,4 (7,5)	70,1 (6,7)	78,0 (5,1)
23	85,8 (10,7)	85,2 (11,1)	96,8 (7,2)
25	86,3 (10,5)	93,2 (13,5)	98,9 (7,4)
29	94,3 (12,2)	120,4 (17,4)	122,7 (12,9)
32	101,7 (12,0)	139,7 (19,2)	132,1 (11,0)
36	107,3 (14,8)	164,7 (22,2)	149,2 (12,2)
37	111,9 (15,1)	171,5 (24,2)	158,0 (12,2)

x = середнє значення; SD = стандартне відхилення

Таблиця 9. Зміни маси тіла самок, обчислені як маса(день_n)-маса(день₀). Період компенсації анемії почався з дня 23 (дивись також Фіг. 9)

Таблиця 9

День	Негативний контроль x (SD)	Позитивний контроль x (SD)	Дослідна група x (SD)
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4	10,8 (1,4)	10,0 (1,3)	11,4 (1,4)
7	21,0 (2,3)	20,1 (0,9)	22,0 (2,2)
11	35,6 (3,5)	35,8 (1,7)	39,0 (3,1)
14	47,9 (4,8)	48,2 (2,0)	53,4 (3,3)
18	61,3 (7,4)	62,9 (2,7)	67,5 (4,7)
22	73,8 (9,5)	75,6 (2,9)	81,7 (5,0)
24	75,5 (8,8)	80,9 (4,5)	84,5 (4,9)
28	84,7 (12,1)	102,6 (4,2)	100,4 (5,6)
29	84,7 (12,1)	102,6 (4,2)	100,4 (5,6)
31	86,4 (12,2)	113,4 (6,6)	109,5 (5,5)
35	97,2 (11,2)	128,6 (10,0)	122,2 (6,1)
36	98,4 (11,1)	132,0 (10,5)	125,8 (7,1)

x = середнє значення; SD = стандартне відхилення

Результати вказують на явну різницю між трьома групами, причому в дослідній групі збільшення маси тіла тварин значно більше та подібне; група, яка одержувала базовий корм, залишалася далеко позаду інших двох груп. Статистично значущих відмінностей між двома групами, які одержували збагачений корм в період компенсації анемії, не виявлено. З іншого боку, маси тіла тварин в обох групах, які одержували збагачений корм (позитивного контролю та дослідної) значно більші, ніж у тварин групи негативного контролю.

Та сама тенденція виявляється при дослідженні ефективності споживання корму. Ефективність корму визначали як:

Ефективність корму = збільшення маси тіла (г)/споживання корму (г)

та стосується ефективності перетворення корму у масу тіла. Обчислені значення ефективності корму для трьох груп тварин в період компенсації анемії представлені в Таблиці 10. В дужках вказано значення стандартного відхилення. Таблиця 10. Ефективність корму для самців і самок на протязі періоду компенсації анемії

Таблиця 10

Ефективність корму	Негативний контроль x (SD)	Позитивний контроль x (SD)	Дослідна група x (SD)
Самці	0,19 (0,03)	0,43 (0,08)	0,36 (0,04)
Самки	0,19 (0,02)	0,32 (0,04)	0,28 (0,03)

x = середнє значення; SD = стандартне відхилення

У групах самців та самок відмінності значущі тільки між групою негативного контролю та будь-якої

з груп, що одержувала збагачений корм, але не між групами, які одержували збагачений корм. Отже, можна зробити висновок, що різниця між сульфатом заліза (II) та мікрокапсулами заліза статистично незначуща, але вона статистично значуща між негативним контролем та мікрокапсулами заліза. Отже, біодоступність мікрокапсульованого заліза має бути аналогічною біодоступності сульфату заліза (II), але без багатьох недоліків, притаманних розчинній солі заліза.

ПРИКЛАД 10. Збагачений йогурт

Випробовувалося введення джерела заліза у формі капсул за цим винаходом у йогурт як матрицю харчового продукту. Випробування капсул шляхом їх введення в йогурт було вибрано з таких міркувань.

- Значення рН йогурту кислотне, досить агресивне для руйнування джерела заліза у формі капсул, вже відомих у галузі. Це спричиняє вивільнення вмісту капсул та псування йогурта.

- Йогурт має високий вміст води - також агресивного середовища для інших відомих джерел заліза. Вміст води разом з кислотністю полегшує солюбілізацію заліза, утруднюючи збагачення.

- Залізо прискорює окиснення жиру, що посилює неприємний смак харчового продукту. В йогуртах вміст жиру може досягати 3 %, що означає достатню кількість окисненої матриці в разі прямого контакту з залізовмісним компонентом збагачувального агента.

Збагачений йогурт був виготовлений з використанням капсул, виготовлених за Прикладом 1 (капсули 0; партія 1 за Прикладом 3). Другу партію йогурту, виготовлену без додання залізовмісних капсул, було використано як контроль.

Виготовлення йогуртів було виконано у відповідності до процесу, наведеного нижче:

1. Кондиціонування та стандартизація 25 л молока шляхом додання порошкового молока при перемішуванні до його повного розчинення до кінцевого вмісту жиру 2,5-3 %.

2. Додання та диспергування 50 г залізовмісних капсул при безперервному перемішуванні (за винятком контрольного йогурту).

3. Пастеризація протягом 90 с при 95 °C.

4. Гомогенізація під тиском 180 кг/см².

5. Введення ферменту при 45 °C.

6. Ферментація при 44 °C протягом 4 год. до досягнення рН йогурту 4,7-4,8.

7. Консервація йогуртів при 4,5 °C строком до 1,5 місяців.

Однією з цілей виготовлення збагаченого йогурту було досягнення відсутності металічного присмаку та візуальне порівняння збагаченого продукту з контрольним йогуртом. Йогурт куштувала група з п'яти нетренованих людей, і жодна з них не змогла розрізнити у збагаченому йогурті навіть легкого металічного присмаку, однак аналіз йогуртів виявив присутність у них $42,5 \pm 4,1$ млн⁻¹ заліза. Було виконано також візуальне зіставлення збагаченого та контрольного йогуртів, і виявлено лише незначне потемніння збагаченого йогурту. Незначна відмінність могла бути зумовлена використанням дуже темної солі заліза і виявлялася лише в разі, якщо йогурти зіставлялися біч-о-біч.

ПРИКЛАД 11. Стабільність капсул у йогурті

Йогурти, виготовлені з застосуванням джерела заліза у формі капсул за цим винаходом, та контрольні йогурти (виготовлені без залізовмісних капсул) були випробувані на окиснення ліпідів шляхом зберігання в умовах більш жорстких, ніж звичайно. Йогурти аналізували по збіганні 150 % терміну їх зберігання, тобто через півтора місяця, при встановленому терміні зберігання 1 місяць. Після цього подовженого терміну зберігання оцінювали ступінь прогірклості, застосовуючи газову хроматографію. Гексаналь, який є одним з продуктів розкладу ліпідів, звичайно застосовується як маркер прогірклості. Здатність людини до розпізнання слідів гексаналю досить висока: людина здатна відчувати прогірклість, якщо рівні гексаналю перевищують приблизно 10 млн⁻¹ (частин на мільйон, або мг/кг середовища). Для забезпечення відсутності чутливості до прогіркання або гарантування, що рівні гексаналю лежать нижче порогу сприймання людиною, для аналізу йогуртів застосовували GC/MS (газову хроматографію з мас-спектрометрією). Цим методом можна кількісно визначати слідові кількості гексаналю до 50 млрд⁻¹ (частин на мільярд, нг/кг), тобто майже на 3 порядки нижче порогу сприймання людиною.

Виготовлення йогуртів виконували як описано в Прикладі 10. Потім для визначення слідів гексаналу виконували аналіз йогуртів методом GC/MS.

Обидві проаналізовані проби містили гексаналь на рівні нижче від 50 млрд⁻¹ (частин на мільярд, нг/кг), тобто менше порогу відчуття прогірклості, який близький до 10 млн⁻¹ (частин на мільйон, нг/г). Отже, капсули є надійним способом ізоляції жиру в йогурті від впливу джерела розчинного заліза та запобігання його окисненню.

ПРИКЛАД 12. Виготовлення збагаченого м'яса та його стабільність

Можливості введення мікрокапсул у харчові продукти випробовувалися на прикладі сосисок з м'яса індички, а також фаршевої емульсії, наприклад, франкфуртських сосисок. Присутність заліза в цих продуктах може викликати окиснення жирів, якщо залізо вивільнюється з мікрокапсул.

Для виготовлення збагачених залізом франкфуртських сосисок використовувалися такі інгредієнти (%): філейна частина свині (40 %); бекон (20 %); суміш домішок, спецій та ароматизаторів (pauymfurt

ST-1800, Carinsa Group; 3,4 %); рослинний протеїн (paymprotein ST-91, Carinsa Group; 3 %); сіль (1,5 %); вода та лід (27,3 %); ароматизатор з запахом копіння (0,2 %); та картопляний крохмаль (5 %).

Залізовмісні мікрокапсули (1 г/кг кінцевої маси) додавали разом з paymfurt ST-1800.

Процес виготовлення франкфуртських сосисок складався з таких стадій:

1. Подрібнення всіх інгредієнтів для перетворення м'яса у тонку пасту з застосуванням льоду для запобігання нагріванню м'яса.

2. Завантаження тонкої пасту у контейнери (пластикові оболонки).

3. Варіння в котлі при 75 °C протягом 45 хв.

4. Пакування під вакуумом та зберігання при 4 °C.

Для виготовлення сосисок з м'яса індички використовувалися такі інгредієнти (%): грудна частина індички (69 %); вода (24 %); суміш домішок та ароматизаторів (Carinsa formula CMA-1251#1; 6 %); кукурудзяний крохмаль (1 %). Залізовмісні мікрокапсули (1 г/кг кінцевої маси) додавали разом з Carinsa formula CMA-1251#1.

Процес виготовлення сосисок з м'яса індички складався з таких стадій:

1. Виготовлення розсолу шляхом змішування води з кукурудзяним крохмалем та сумішшю CMA-1251#1.

2. Подрібнення м'яса.

3. Змішування подрібненого м'яса під вакуумом з розсолом та витримування для вимочування протягом 24 год.

4. Виготовлення тонкої пасту шляхом подрібнення частини м'яса до одержання тонкої пасту.

5. Завантаження м'яса у контейнери (пластикові оболонки).

6. Варіння в котлі при 75 °C до досягнення внутрішньої температури 72 °C.

7. Пакування під вакуумом та зберігання при 4 °C.

Кількість заліза в зразках визначали методом оптичної емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-OES) після витримування проб у концентрованій HNO_3 у мікрохвильовій печі. Результати, виражені в млн^{-1} (частинах на мільйон, мг/кг), показані в таблиці 11. Значення в дужках показують стандартне відхилення (у відсотках).

Таблиця 11

Зразок	Без домішки млн^{-1} Fe	Збагачений залізом млн^{-1} Fe
Франкфуртські	12,9 (2,5 %)	145 (3,3 %)
3 м'яса індички	6,8 (4,4 %)	112 (4,7 %)

Здатність мікрокапсул до виключення окиснення жирів було визначено шляхом визначення кількості гексаналю, присутнього у пробах. Гексаналь є звичайним маркером окиснення жирів, оскільки він є одним з головних продуктів окиснення жирів. Його концентрація вимірюється на початку та в кінці терміну зберігання сосисок (день 0 та день 60), і порівнюється між пробами, збагаченими залізом ($> 100 \text{ млн}^{-1}$ Fe), та пробами без домішки заліза ($< 10 \text{ млн}^{-1}$ Fe). Зразки зберігаються на протязі терміну зберігання охолодженими і були заморожені при -80°C до проведення аналізу. Гексаналь визначали методом HS-GC-MS (газовою хроматографією парового простору з мас-спектрометрією). Результати, виражені в млн^{-1} гексаналю (частинах на мільйон, мг/кг), показані в таблиці 12. Значення в дужках показують стандартне відхилення (у відсотках).

Таблиця 12

Сосиска	день	Без заліза млн^{-1} гексаналю	Збагачений залізом млн^{-1} гексаналю
Франкфуртська	день 0	0,21 (0,07)	0,35 (0,12)
Франкфуртська	день 60	$< 0,20$	0,22 (0,07)
3 м'яса індички	день 0	0,45 (0,16)	0,69 (0,24)
3 м'яса індички	день 60	0,55 (0,19)	0,96 (0,33)

Зіставлення цих результатів у день 0 свідчить, що, хоча кількість гексаналю може видатися більшою у зразках, збагачених залізом, статистично кількість гексаналю не може розглядатися як різна. Отже, мікрокапсули ефективно запобігають окисненню жирів, викликаному присутністю заліза, на найбільш агресивних стадіях виготовлення сосисок, а саме на стадії їх варіння. Те саме стосується результатів для кінця терміну зберігання - після зберігання зразків протягом 2 місяців. Різниця результатів між зразками, збагаченими залізом, і зразками без заліза статистично не значуща. Крім того, при зіставленні результатів для одного й того самого зразка, одержаних на початку і в кінці його терміну зберігання, різниця виявляється незначущою. Отже, можна зробити висновок, що присутність

заліза у формі мікрокапсул істотно не змінює швидкість окиснення жирів у випробуваних зразках м'яса.

ПРИКЛАД 13. Опір мікрокапсул гомогенізації

Однією з ключових стадій при виготовленні численних харчових продуктів, зокрема, молочних продуктів, є стадія гомогенізації, на якій рідину або суспензію піддають високим напругам зсуву. Як результат, частинки суспензії, наприклад, кульки жиру, руйнуються, надаючи суспензії більшого ступеня однорідності. Ця напруга зсуву викликає також руйнування мікрокапсул і вивільнення їх вмісту в надосадову рідину, і, отже, зменшує ефективність захисту.

Для визначення, якою мірою гомогенізація мікрокапсул впливає на вивільнення їх вмісту в надосадову рідину, було виготовлено 7,9 л суспензії, яка містила $10,38 \text{ млн}^{-1}$ мікрокапсульованого заліза, з застосуванням 7,9 л деіонізованої води та 1,025 г мікрокапсул. Зразок ретельно перемішували та безперервно подавали в одностадійний гомогенізатор, налаштований на зусилля між 20 МПа та 100 МПа. Відбирали 100 мл зразку після налаштування зусилля на бажане значення та стабілізації системи. Обрані були значення зусиль 20 МПа, 35 МПа, 50 МПа та 100 МПа. Після гомогенізації кожний зразок залишали на 8 діб у закритій посудині без перемішування. Безпосередньо перед аналізом зразки піддавали мікрофільтруванню (фільтр з розміром отворів 0,45 мкм). До кожного мікрофільтрованого зразка додавали концентровану HNO_3 до кінцевої концентрації 0,5 % (за об'ємом) для стабілізації заліза у суспензії. Залізо в підкисленій надосадовій рідині визначали методом ICP-OES.

Кількість заліза в надосадовій рідині і відповідну кількість заліза, вивільнену з мікрокапсул при різному тиску гомогенізації, представлено нижче у Таблиці 13. Зразок, позначений як гомогенізований при 0 МПа, не піддавали гомогенізуванню, а зразок, позначений 20 ("пустий"), гомогенізували при зусиллі 20 МПа, але він містив лише деіонізовану воду.

Таблиця 13

Гомогенізація (МПа)	Fe (млн^{-1})	% вивільненого Fe
0	0,15	1,44 %
20	0,16	1,54 %
35	0,18	1,73 %
50	0,18	1,73 %
100	0,19	1,83 %
20 (пустий)	0,013	0,125 %

Як видно з поданих вище результатів, стабільність мікрокапсул є задовільною.

Навіть при використанні найбільших зусиль з мікрокапсул вивільнюється лише незначна частина заліза.

ПРИКЛАД 14. Виготовлення та стабільність збагаченого молока

Випробувано введення джерела заліза у формі капсул за цим винаходом в молоко як харчовий продукт. Випробування капсул шляхом введення їх в молоко було вибрано з таких міркувань:

- Молоко є рідким харчовим продуктом, що спрощує вивільнення інших продуктів - джерел заліза, відомих на цей час. Це ускладнює збагачення цільного молока, на відміну від збагачення знятого молока, оскільки у присутності заліза молочний жир окиснюється, надаючи молоку неприємний присмак.

- Будучи рідиною, молоко не може легко бути збагачене твердим харчовим продуктом, оскільки цей продукт схильний до осадження на дно контейнера.

Цільне коров'яче молоко, одержане від локального фермера, тримали охолодженим (4°C) до обробки. Тридцять п'ять грамів вологих мікрокапсул (75 % вологості), диспергували у 600 мл дистильованої води. 50 л молока обробляли без домішки заліза, а до 50 л молока додавали 600 мл суспензії мікрокапсул. До обох зразків молока додавали 1 г/л E-339. Спочатку 50 л молока без заліза, а потім 50 л молока з доданим залізом у формі мікрокапсул (а) поступово нагрівали до 75°C і після досягнення цієї температури гомогенізували з застосуванням двостадійного гомогенізатора (на першій стадії 18 МПа, на другій 4 МПа); (b) після досягнення температури 90°C витримували при цій температурі протягом 1 хв; (c) молоко обробляли при надвисокій температурі (UHT) протягом 15 с при 135°C ; і (d) молоко охолоджували до кімнатної температури і розливали в нестерильні скляні пляшки ємністю 0,5 л.

Після розливання обидва зразки молока тестували і не виявили жодного металічного присмаку. Для запобігання мікробіологічного забруднення молока його автоклавували при 121°C протягом 15 хв. Після охолодження молоко зберігали при 4°C . Наприкінці терміну зберігання (1 місяць) кількісно визначали гексаналь у молоці.

На початку та наприкінці терміну зберігання візуально перевіряли фізичний зовнішній вигляд

молока. Жодних слідів осадження не виявлено, але можна було розрізнити збагачене залізом молоко за більш темним кольором. Смак та запах молока перевіряли після виготовлення. Не виявлено жодного неприємного або металічного присмаку в обох зразках молока. Між збагаченим залізом молоком та незбагаченим молоком не виявлено фактично ніяких відмінностей смаку або запаху. Відсутність запаху або смаку прогрітості повністю узгоджується з визначеною кількістю гексаналю в обох зразках молока наприкінці терміну зберігання: гексаналь неможливо було визначити в пробах молока, отже, в разі його присутності його концентрація становила менше 10 мкг/л.

ПРИКЛАД 15. Виготовлення мікрокапсул з застосуванням ацетату кальцію

Висока концентрація кальцію, застосовувана при виготовленні мікрокапсул, може викликати проблеми, пов'язані з корозією, якщо як сіль використовується хлорид кальцію. Причина цього полягає в тому, що хлорид-аніони дуже агресивні до сталі - матеріалу, звичайно застосовуваного для виготовлення ємнісної апаратури, трубопроводів та механічних мішалок. З метою уникнення цих ускладнень та використання переваг того факту, що аніони хлориду не відіграють ролі в процесі виготовлення мікрокапсул, була виготовлена партія мікрокапсул з використанням іншої солі кальцію - зокрема, ацетату кальцію.

На відміну від хлориду кальцію, який дуже інтенсивно розчиняється у воді, ацетат кальцію менш розчинний; отже, початкові концентрації кальцію (5М) не досягаються. Замість них використано нижчу концентрацію (1,8М).

Методика, використана для виготовлення мікрокапсул, не відрізнялася від методики виготовлення капсул з застосуванням хлориду кальцію:

В розчині 1,5 г альгілату натрію у 100 мл води розчиняли 16 г сахарату заліза (III) (приблизно 35 % Fe). З застосуванням ділильної лійки суміш альгілату натрію та сахарату заліза (III) краплями додавали до 70 мл розчину 1,8М $\text{Ca}(\text{AcO})_2$. Під час додавання краплями суспензію капсул перемішували в лабораторному гомогенізаторі (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). Одержані тверді капсули відділяли шляхом фільтрування під вакуумом. Капсули тричі суспендували в дистильованій воді для видалення розчинних солей і знову фільтрували під вакуумом. Було одержано 35,6 г вологих капсул.

Вимірювання вмісту Fe та Ca виконували за методикою Прикладу 3. Стабільність капсул визначали, вимірюючи вивільнення Fe та Ca в день 0, за методикою Прикладу 6. Відсоток вологості та відсоток твердого залишку визначали за такою методикою:

1. Зважування скляної посудини ($\text{weight}_{\text{empty}}$)
2. Відважування приблизно 1 г мікрокапсул у посудину. Нове зважування посудини ($\text{weight}_{\text{wet}}$)
3. Вміщення посудини у сушильну шафу при 110-120 °C на 2 год.
4. Охолодження посудини з сухими мікрокапсулами до кімнатної температури протягом 30 хв.
5. Нове зважування посудини з мікрокапсулами. ($\text{weight}_{\text{dry}}$)
6. Повторне сушіння та зважування до постійної маси.
7. Обчислення вологості (humidity) як

$$\% \text{ humidity} = 100 \frac{\text{weight}_{\text{wet}} - \text{weight}_{\text{dry}}}{\text{weight}_{\text{wet}} - \text{weight}_{\text{empty}}}$$

Одержані результати:

- Вміст Fe: 15,0 % Fe (мас.) у вологих мікрокапсулах, 45,4 % (мас.) у сухих мікрокапсулах
- Вміст Ca: 0,6 % Ca (мас.) у вологих мікрокапсулах, , 1,9 % (мас.) у сухих мікрокапсулах
- Вологість: 66,9 % (33,1 % сухого залишку)
- Вивільнення Fe та Ca: 0,2 % вивільненого Fe та 8,2 % вивільненого Ca

ПРИКЛАД 16. Стійкість до нагрівання

Придатність мікрокапсул для харчових продуктів випробувана додатково шляхом перевірки їх відношення до високих температур, застосовуваних при варінні або стерилізації харчових продуктів, які впливають на утримання корисного компонента (заліза) всередині мікрокапсул.

1 г мікрокапсул відважували в дві зважених скляних посудини. У шафі, встановленій на 125 °C, один зі зразків витримували протягом 30 хв, а другий зразок залишали протягом 180 хв. Після охолодження капсул до кімнатної температури кожну посудину знову зважували. 40 мг сухих мікрокапсул суспендували у 100 мл деіонізованої води, і суспензію перемішували вручну. 1 мл кожної суспензії розводили до 10 мл з 9 мл деіонізованої води. Проби фільтрували для видалення твердих речовин із суспензії. Потім додавали до кожної проби 50 мкл концентрованої азотної кислоти для стабілізації заліза в суспензії, і проби аналізували методом ICP-OES для аналізу вивільненого заліза та кальцію.

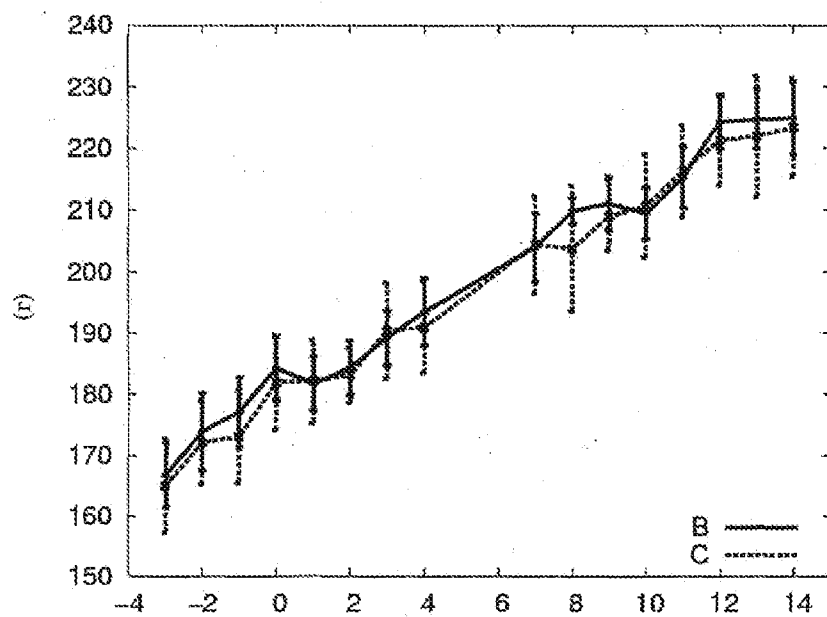
Безпосередньо перед фільтруванням суспензія мікрокапсул містила загальну концентрацію 11 млн^{-1} Fe. Надосадова рідина після фільтрування містила тільки залізо, вивільнене з мікрокапсул, яке

було кількісно визначене ICP-OES. Було одержано такі результати:

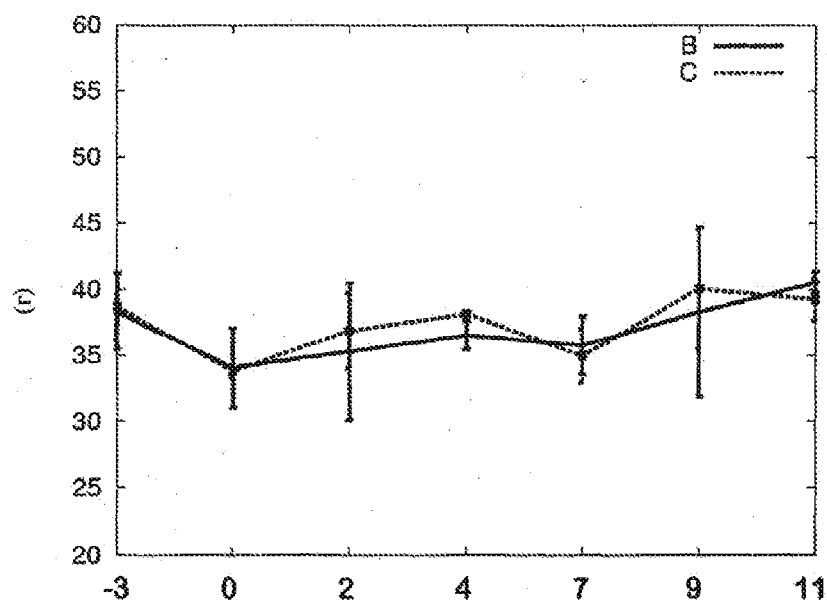
30 хв, 125 °C: 0,04 млн⁻¹ Fe

180 хв, 125 °C: 0,03 млн⁻¹ Fe

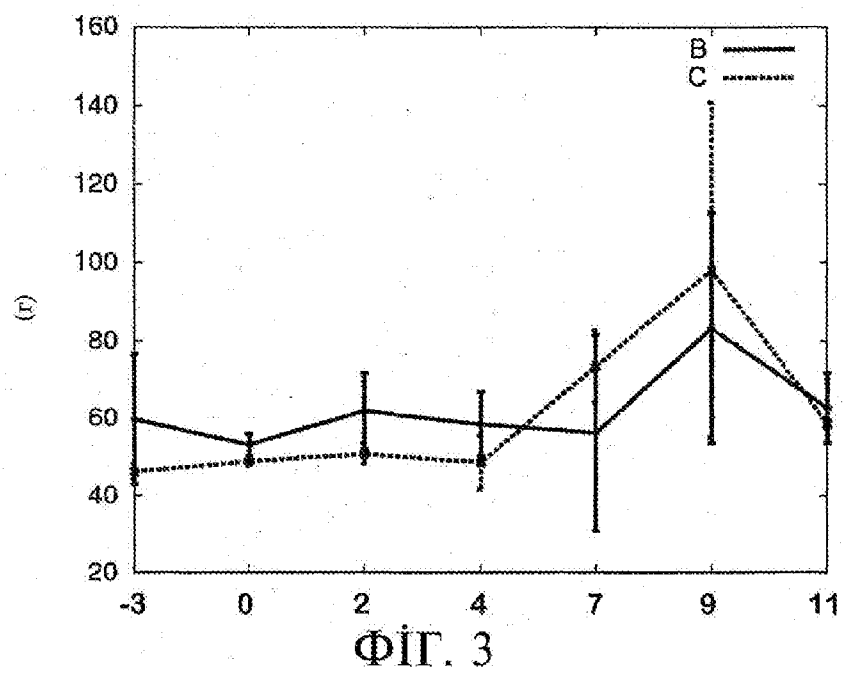
В обох випадках внаслідок нагрівання з мікрокапсул вивільнювалося менше 1 % заліза. Отже, мікрокапсули можна вважати стабільними навіть після значно більш агресивних впливів, ніж зазвичай застосовуються при термічній обробці харчових продуктів (3 год. при 125 °C).



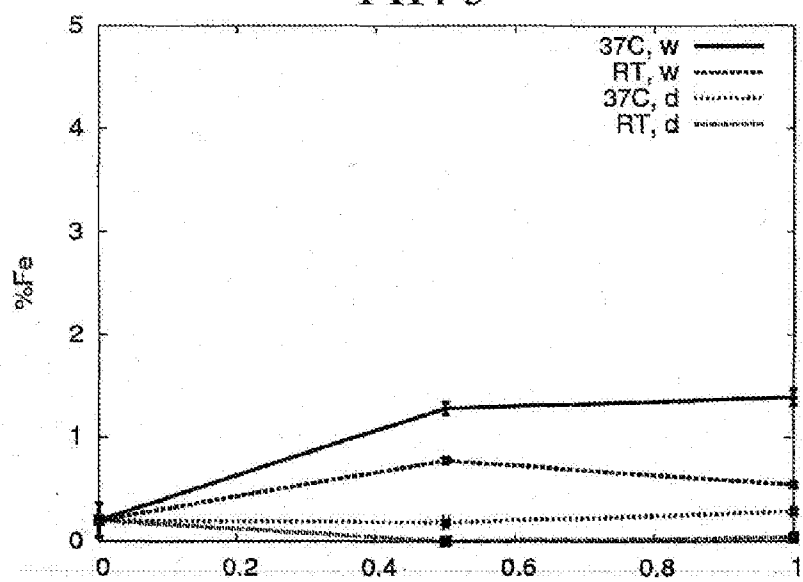
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ΦΓ. 3



ΦΓ. 4

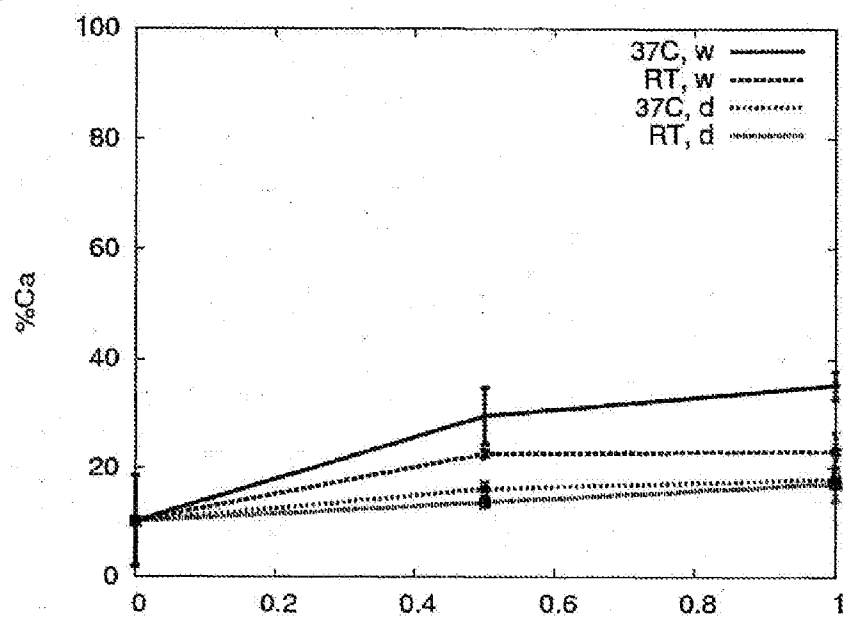


FIG. 5

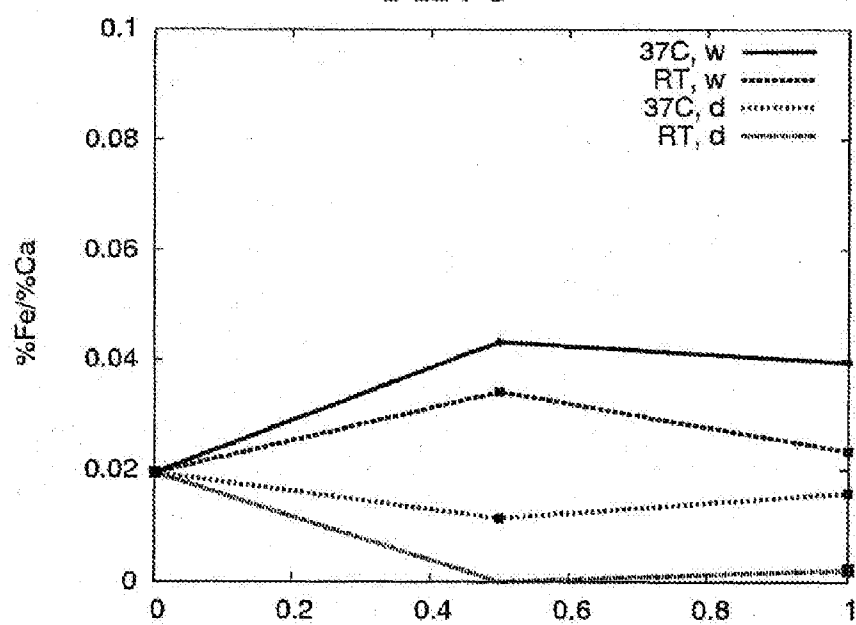
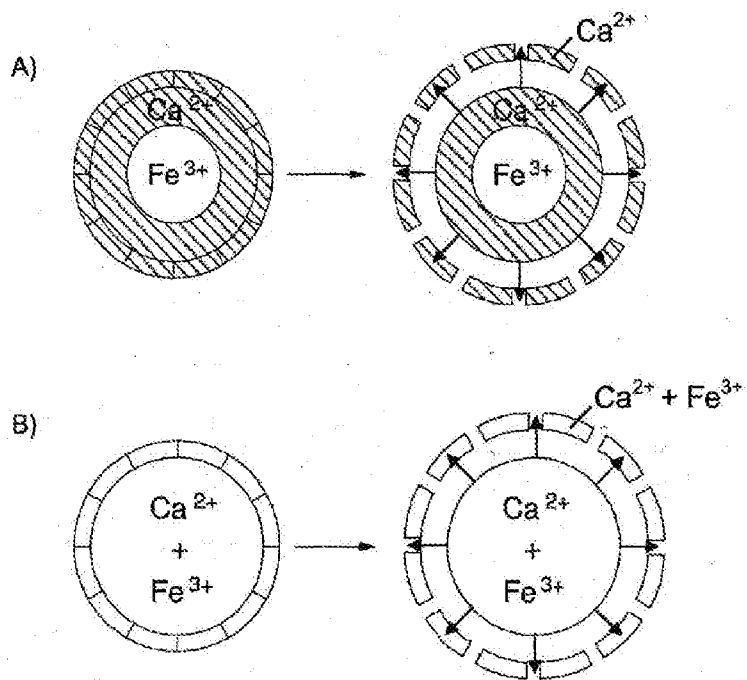
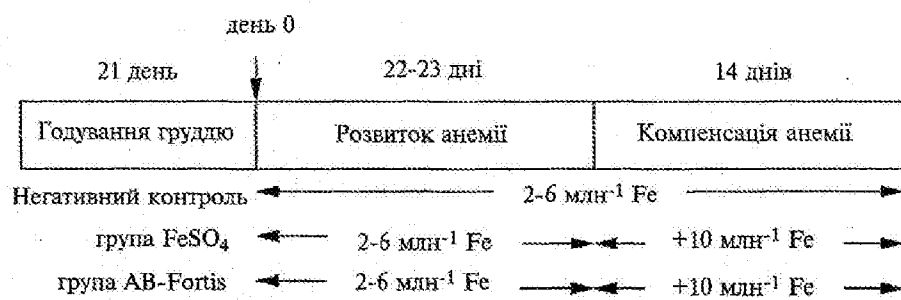


FIG. 6



ФІГ. 7



ФІГ. 8

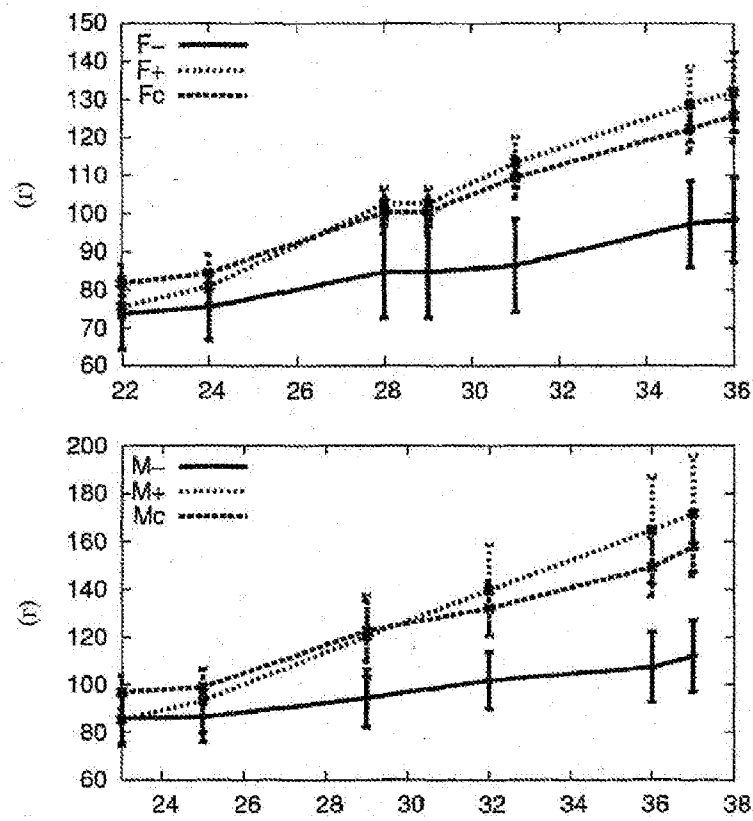


FIG. 9