

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2515>
<https://elibrary.ru/THQOKZ>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Микронизация в технологии минорного компонента консервирующего действия



Е. В. Аверьянова^{1,*}, М. Н. Школьников^{1,2},
Н. В. Павлова¹, Е. Д. Рожнов^{1,2}

¹ Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова», Бийск, Россия

² Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию: 08.02.2024

Принята после рецензирования: 28.02.2024

Принята к публикации: 05.03.2024

*Е. В. Аверьянова: averianova.ev@bti.secna.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

М. Н. Школьников: <https://orcid.org/0000-0002-9146-6951>

Н. В. Павлова: <https://orcid.org/0009-0003-6367-0212>

Е. Д. Рожнов: <https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

© Е. В. Аверьянова, М. Н. Школьников, Н. В. Павлова,
Е. Д. Рожнов, 2024



Аннотация.

Мировая тенденция в производстве продуктов питания – использование натуральных консервантов, в частности растительных, в виде пряностей. Для ингибирования микробной активности весьма значимы флавоноиды, эффективное применение которых возможно при равномерном распределении в пищевой матрице, что достигается за счет повышения их растворимости, в том числе – микронизацией. Цель настоящего исследования – оценка целесообразности и эффективности микронизации растительного консерванта на примере очищенной флавоноидной фракции, полученной из обезжиренного облепихового шрота.

Объектами исследования являлись образцы очищенной флавоноидной фракции облепихового шрота разной дисперсности. Для микронизации облепихового шрота применяли криогенное измельчение и ультразвуковое воздействие. Провели оценку растворимости, антиоксидантной, антимикробной и фунгицидной активности исследуемых образцов стандартными методами.

Показали, что микронизация в условиях ультразвукового воздействия и криогенное измельчение повышают растворимость компонентов образцов в воде, этиловом спирте и растительном масле. Доказали эффективность и преимущества ультразвуковой технологии микронизации для получения частиц с размером 1400 нм при рациональных режимах: мощность ультразвуковых колебаний 50 Вт в течение 10 мин. в 0,5 % суспензии. Полученный таким способом образец увеличивает скорость каталазной реакции на 19 % по отношению к контрольному образцу при постоянстве скорости глутатионредуктазной реакции, что способствует увеличению антиоксидантной активности опытного образца в четыре раза. Установлено, что образцы обладают бактериостатической активностью в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* и фунгистатической – в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Полученный микронизацией в условиях ультразвукового воздействия образец очищенной флавоноидной фракции облепихового шрота может быть рекомендован для использования в качестве природного консерванта в различных пищевых системах.

Ключевые слова. Природный консервант, флавоноиды, микронизация, биодоступность, дисперсность, антиоксидантная активность, антимикробная активность

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (ГЗ № 075-00042-24-00, номер темы FZMM-2024-0003).

Для цитирования: Микронизация в технологии минорного компонента консервирующего действия / Е. В. Аверьянова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 3. С. 508–521. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2515>

Micronization of Small-Amount Preservatives



Elena V. Averyanova^{1,*}, Marina N. Shkolnikova^{1,2},
Natalia V. Pavlova¹, Evgeny D. Rozhnov^{1,2}

¹ Biysk Technological Institute, Altay State Technical University, Biysk, Russia

² Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia

Received: 08.02.2024

Revised: 28.02.2024

Accepted: 05.03.2024

Elena V. Averyanova: averianova.ev@bti.secna.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Marina N. Shkolnikova: <https://orcid.org/0000-0002-9146-6951>

Natalia V. Pavlova: <https://orcid.org/0009-0003-6367-0212>

Evgeny D. Rozhnov: <https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

© E. V. Averyanova, M. N. Shkolnikova, N. V. Pavlova, E. D. Rozhnov, 2024



Abstract.

Natural preservatives are a global trend in the food industry. As a rule, they are traditional herbs or spices. Flavonoids inhibit microbial activity. However, they are effective only when their distribution in the food matrix is uniform. This uniformity is achieved by increasing their solubility, e.g., by micronization. The research assessed the feasibility and effectiveness of micronization of a plant preservative using a purified flavonoid fraction obtained from defatted sea-buckthorn meal.

The study featured samples of purified flavonoid fraction of sea-buckthorn meal with different dispersions. Their solubility, antioxidant properties, antimicrobial activity, and fungicidal effect were assessed by standard methods.

Micronization under ultrasonic conditions and cryogenic grinding increased the solubility in water, ethyl, and oil. Ultrasonic micronization proved efficient as it produced particles of 1,400 nm under rational conditions, i.e., 50 W ultrasonic vibration in a 0.5% suspension for 10 min. The sample obtained in this way increased the rate of catalase reaction by 19% relative to the control sample while maintaining a constant rate of glutathione reduction. Its antioxidant activity increased fourfold. The samples demonstrated bacteriostatic activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, as well as fungistatic activity against *Candida albicans*.

Purified flavonoid fraction of sea-buckthorn meal micronized under ultrasonic conditions can be recommended as a natural preservative in various food systems.

Keywords. Vegetable preservative, flavonoid fraction, micronization, bioavailability, dispersion, antioxidant activity, antimicrobial activity

Funding. This research was part of State Assignment no. 075-00042-24-00, FZMM-2024-0003, from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Averyanova EV, Shkolnikova MN, Pavlova NV, Rozhnov ED. Micronization of Small-Amount Preservatives. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(3):508–521. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2515>

Введение

Качество и безопасность сырья и пищевых продуктов, от которых зависят здоровье, трудовая активность населения и, в конечном счете, темпы экономического развития страны, оценивают по химико-технологическим, органолептическим и микробиологическим показателям [1].

Установили, что вспышки болезней пищевого происхождения находятся на подъеме даже в развитых странах, что обусловлено несколькими причинами, в том числе ростом потребления свежих продуктов с коротким сроком годности ввиду их минимальной обработки (например, готовые к употреблению фрукты и

овощи, мясо и морепродукты), появлением новых рисков микробной контаминации в связи с изменениями методов производства пищевых продуктов, модификацией генетических характеристик соответствующих патогенных микроорганизмов и т. д. Большинство продуктов питания имеют длительные сроки годности, что обеспечивается за счет использования соответствующих технологий консервирования и/или использования специальных пищевых добавок – консервантов [2].

В ГОСТ Р 54956 дано понятие термина «консервант пищевого продукта» – пищевая добавка, предназначенная для защиты пищевых продуктов от микробиологической порчи и увеличения сроков хранения

или годности (E200–299). ТР ТС 029/2012 определяет «консервант» как пищевую добавку, предназначенную для продления (увеличения) сроков годности пищевой продукции путем защиты от микробной порчи и/или роста патогенных микроорганизмов. Вместе с тем, согласно данному нормативному документу к консервантам относят и категорию пищевых добавок антиоксидантов / антиокислителей (E301–399): «антиокислитель» – пищевая добавка, предназначенная для замедления процесса окисления и увеличения сроков годности пищевой продукции (пищевого сырья), что согласуется с мировой практикой [3].

В последние несколько лет наблюдается устойчивый потребительский спрос на максимально натуральные и безопасные продукты питания, в том числе с натуральными и легко узнаваемыми пищевыми добавками, в том числе консервирующего действия. Сложившаяся тенденция побуждает производителей продуктов питания вести поиск безопасных и эффективных заменителей искусственных консервантов [4].

На сегодняшний день большинство используемых консервантов являются искусственными – нитраты, нитриты, сульфиты, бензоат натрия, сорбат калия и др. При этом некоторые из них обладают потенциально опасными для жизни побочными эффектами, что показано в ряде исследований: методом биотестирования на лабораторной культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis* изучена токсикологическая безопасность сорбата калия (E202) и бензоата натрия (E211) [5]. Доказали дозозависимость воздействия E202 при употреблении человеком в дозировке $> 0,015\%$ как нетоксичное, употребление же E211 является нежелательным даже в минимальных концентрациях. В более поздних работах приведены сведения по отрицательному влиянию искусственных консервантов на здоровье человека, провоцирующих гиперчувствительность, аллергию, астму, гиперактивность и другие неврологические нарушения [6–8].

По мнению ряда исследователей, потребители осведомлены о негативных последствиях использования искусственных консервантов в употребляемых ими продуктах. В связи с этим в последние годы значительный интерес у производителей продуктов питания во всем мире вызывают натуральные консерванты – продукты переработки сырья животного происхождения (хитозан, лизоцим, лактоферрин и др.), продукты жизнедеятельности микроорганизмов (бактериоцины, вырабатываемые грамположительными и грамотрицательными бактериями – низин, натамицин, органические кислоты и др.) и вторичные метаболиты растений (фенольные вещества, терпены, в т. ч. в составе эфирных масел, алкалоиды, органические кислоты и др.) [9].

Весьма широк и разнообразен перечень вторичных метаболитов растений и их источников: овощи, фрукты и травянистые растения – лекарственно-технические и пряно-ароматические. В этой связи можно говорить об их доступности и возможности использования в рецеп-

турах пищевых продуктов в качестве консервантов за счет проявления антибактериальной активности в отношении вызывающих порчу продуктов патогенных и условно патогенных микроорганизмов и антиоксидантного действия [10]. Наиболее полно эффективность и механизм антимикробного действия в различных пищевых системах изучены для эфирных масел, в том числе в составе растительных экстрактов (табл. 1) [10, 11].

Эфирные масла растений обладают наибольшей активностью в отношении родов *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Clostridium*. Установлено, что эфирное масло из листьев мяты перечной *Mentha piperita* L., семян аниса обыкновенного *Pimpinella anisum* L. предотвращает рост как условно патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, так и патогенных – *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. Эфирные масла коры корицы китайской *Cinnamomum cassia* L. и почек гвоздики *Syzygium aromaticum* L. уменьшают рост дрожжей и плесени и продлевают срок годности сушеной рыбы, а эфирные масла из кожуры цитрусовых, распыленные на хлеб, ингибируют плесень и снижают общую обсемененность [10].

В исследовании М. Соггуз приведены сведения по антибактериальной активности сапонинов и флавоноидов берсамы английской (*Melanthaceae*) в отношении грамотрицательных бактерий [11].

Воздействие натуральных консервантов на микроорганизмы имеет различный механизм, зависящий как от их вида и строения, так и от ряда факторов – температура, концентрация консерванта, фазовое состояние системы, pH среды и т. д. Нарушение жизненных функций клеток микроорганизма и их гибель является наилучшим результатом (бактерицидное действие); однако наиболее часто происходит ингибирование функций клеточных стенок / мембран микроорганизмов, репликации и транскрипции ДНК, синтеза белка и метаболизма (бактериостатическое действие) [12].

Ряд исследователей отмечают преимущества использования консервантов растительного происхождения, основные из которых: доступность и невысокая стоимость сырьевой базы, наряду с консервирующим действием БАВ растительного сырья, многостороннее и щадящее воздействие на организм человека, отсутствие или незначительность проявления побочных эффектов и др. [13, 14]. Натуральные консерванты растительного происхождения употребляются человеком давно в виде экстрактов трав и пряностей (мята, гвоздика и т. д.).

С точки зрения ингибирования микробной активности весьма значимы такие вторичные метаболиты растений, как фенольные вещества: флавоноиды, хиноны, кумарины, фенольные кислоты, дубильные вещества, фенолы, флавоны и флавонолсодержащие соединения, количество и взаимное расположение гидроксильных групп, в которых связаны с их антибактериальной активностью: чем больше количество гидроксильных

Таблица 1. Антимикробное действие эфирных масел

Table 1. Antimicrobial effect of essential oils

Источник эфирного масла	Микроорганизм-мишень	Концентрация	Антимикробное действие	Пищевой продукт/сырье
Чабер зимний (лат. <i>Satureja horvatii</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10–20 мг/мл	полное ингибирование	мясо свинины
Тимьян ползучий (лат. <i>Thymus serpyllum</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,8–1,2 %	снижение количества жизнеспособных клеток в 100 раз, начиная с шестого дня до окончания хранения	рыбный фарш
Душица обыкновенная (лат. <i>Origanum vulgare</i>) и китайской корицы (лат. <i>Cinnamom cassia</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,5 мг/г	замедление темпов роста колоний микроорганизмов при использовании душицы и кассии на 19 % и 10 % соответственно	ветчина
Лавр благородный (лат. <i>Folium lauri</i>)	Колиформы (БГКП, бактерии группы кишечной палочки)	1,0 мг/г	снижение общего количества колиформных бактерий на 2,8 порядка на 12-й день	колбаса тосканская свежеприготовленная
Вербена лекарственная (лат. <i>Verbena officinalis</i>)	<i>Monilinia laxa</i> , <i>Monilinia fructigena</i>	1,0 мг/г	уменьшение диаметра поражений бурой гнилью	персики свежие
Агератум (лат. <i>Ageratum conyzoides</i>)	<i>Penicillium roqueforti</i>	1,0 мг/г	подавляет развитие голубой плесени	мандарины свежие
Тимьян ползучий (лат. <i>Thymus serpyllum</i>) + листья лимона (лат. <i>Citrus limon</i>)	<i>Escherichia coli</i> (шиггетоксинпродуцирующий штамм O157:H7)	75 мкл/л	снижение количества жизнеспособных клеток на 5 порядков от первоначальной популяции	сок яблочный
Лимон (лат. <i>Citrus limon</i>)	<i>Escherichia coli</i> (шиггетоксинпродуцирующий штамм O157:H7)	0,1 мл/100 г	снижение количества жизнеспособных клеток на 1,7 порядка от первоначальной популяции	шоколад
Семейство Яснотковые (лат. <i>Lamiaceae</i>) (тимьян, котовник, шандра, мята)	<i>Aspergillus niger</i>	0,25–0,50 мг/мл	ингибирование	плоды и овощи
Полынь (лат. <i>Artemisia</i>), багульник (лат. <i>Léduum</i>), сосна (лат. <i>Pinus</i>), базилик (лат. <i>Ócimum</i>)	<i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	31,2–62,5 мкг/мл	ингибирование	плоды и овощи
Экстракт листьев оливы культурной (лат. <i>Olea europaea</i>)	Общее количество жизнеспособных бактерий	2 %	снижение количества жизнеспособных клеток на 2 порядка	креветки сырые очищенные
Экстракт внутренней скорлупы конского каштана обыкновенного (лат. <i>Aesculus hippocastanum</i>)	<i>Campylobacter Jejuni</i>	2 мг/г	полное ингибирование	мясо курицы
Экстракт кожуры граната (лат. <i>Punicaceae</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	0,01 %	увеличение срока хранения на 2–3 недели за счет ингибирования микроорганизмов	мясо курицы

групп, тем выше токсичность в отношении микроорганизмов. На сегодняшний день более 1340 растений обладают противомикробными свойствами, из которых выделено более 30 000 соединений с противомикробной активностью [12].

Важным условием эффективного использования натурального консерванта / антиоксиданта является его равномерное распределение в продукте / пищевой системе, что достигается за счет повышения их растворимости, в том числе за счет микронизации. Уменьше-

ние размера до микронного и наноразмерного диапазона, влекущее значительное улучшение физико-химических и функциональных характеристик пищевого сырья и ингредиентов, и, как следствие, качество пищевых продуктов, является быстро развивающейся технологией в индустрии питания [15].

Вышесказанное обусловило цель настоящего исследования: оценка целесообразности и эффективности микронизации растительного консерванта на примере очищенной флавоноидной фракции, полученной из обезжиренного облепихового шрота.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были определены:

- очищенная флавоноидная фракция, выделенная из обезжиренного облепихового шрота (далее по тексту флавоноидная фракция) по [16], с последующим выделением флавонолов методом препаративной хроматографии (образец 1, контроль);
- микронизированная очищенная флавоноидная фракция облепихового шрота (МОФФ ОШ), полученная при криогенном измельчении (образец 2). Криогенное измельчение при помощи удара и трения проводилось в вибрационной шаровой мельнице с автоматической криогенной системой в комплекте Retsch CryoMill (Германия) с частотой до 30 Гц, при непрерывном охлаждении жидким азотом в объёме, необходимом для поддержания температуры $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- МОФФ ОШ, полученная микронизацией в условиях ультразвукового воздействия (образец 3) аппаратом «ВОЛНА» (модель УЗТА-0,4/22-ОМ), работающим на частоте $22 \pm 1,65\text{ кГц}$ с выходной мощностью 180–400 Вт.

Органолептические показатели образцов флавоноидной фракции определяли аналогично флавоноиду дигидрокверцетину по ГОСТ 33504.

Массовую долю влаги в образцах флавоноидной фракции определяли титрованием по методу Фишера (полумикрометод) в соответствии с ОФС.1.2.3.0002.15 с использованием автоматического титратора Mettler Toledo V20S (Швейцария) с электродом DM143-SC в составе.

Анализ качественного и количественного состава образцов до и после микронизации осуществлялся методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием на приборе Shimadzu «LC-20 Prominence» (Япония) с последующей компьютерной обработкой полученных результатов по [16].

Растворимость компонентов образцов флавоноидной фракции в различных пищевых средах / растворителях (вода, масло подсолнечное рафинированное дезодорированное, спирт этиловый 96 % об.) определяли до и после микронизации методом ВЭЖХ по концентрации каждого из компонентов флавоноидной фракции в испытуемых растворах. Итоговым результатом являлась сумма растворимостей всех компонентов.

Исследование морфологии частиц образцов флавоноидной фракции и их содержание (%) проводилось в проходящем свете при освещении по методу светлого поля с использованием медицинского микроскопа МИКМЕД-5 (Россия) с бинокулярной насадкой.

Дисперсный анализ образцов флавоноидной фракции проводился с использованием микроскопа OLYMPUS OMEC DC130 (Япония), полученные данные проанализированы с помощью программного обеспечения OLYMPUS Particle Image Processor (PIP 9.0).

Консервирующую способность образцов флавоноидной фракции определяли по антиоксидантной активности и их способности подавлять рост бактерий:

- антиоксидантную активность: амперометрическим методом с использованием жидкостного хроматографа «ЦВЕТ ЯУЗА-01-АА» в соответствии с ГОСТ Р 54037, стандарт кверцетин; в опытах *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем – глутатионредуктазы и каталазы. Скорость глутатионредуктазной и каталазной реакций определяли спектрофотометрически, с использованием полуавтоматического биохимического анализатора Clima MC-15 (Италия) [17];
- антибактериальную активность определяли общепринятыми микробиологическими методами в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, а также дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231, содержание которых в пищевых продуктах регламентируется ТР ТС 021/2011 [18].

Для объективной и достоверной оценки влияния условий и параметров микронизации на размер частиц и растворимость МОФФ ОШ в различных средах использовали методы математической статистики обработки экспериментальных данных с применением программы Microsoft Office Excel 2019, что позволило прогнозировать результаты дальнейших исследований.

Экспериментальные исследования проводились в трехкратных повторностях для каждого из вариантов опыта и контроля с доверительной вероятностью 0,95. Обработка результатов исследований *in vitro* проведена с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 10,0 (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости *P* при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Флавоноидная фракция облепихового шрота представляет собой смесь рутина, кверцетина, нарциссина, мирицетина, кемпферола и изорманетина, некоторые физико-химические показатели которых представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что флавоноиды отличаются относительно высокими для органических соединений температурами плавления

Таблица 2. Физико-химические показатели флавоноидов облепихового шрота

Table 2. Physical and chemical parameters of flavonoids in sea-buckthorn meal

Соединение	Температура плавления, °С	Растворимость в воде, г/л	Растворимость в этиловом спирте, г/л
Рутин	195,0	12,5	10,0 (горячий)
Кверцетин	316,0	менее 0,1	0,35 (при 21 °С) 10,0 (горячий)
Кемпферол	276,0	не растворим	10,0 (горячий)
Изорамнетин	306,0	не растворим	10,0 (горячий)
Нарциссин	181,0	растворим	плохо растворим
Мирицетин	> 300 °С	не растворим	10,0

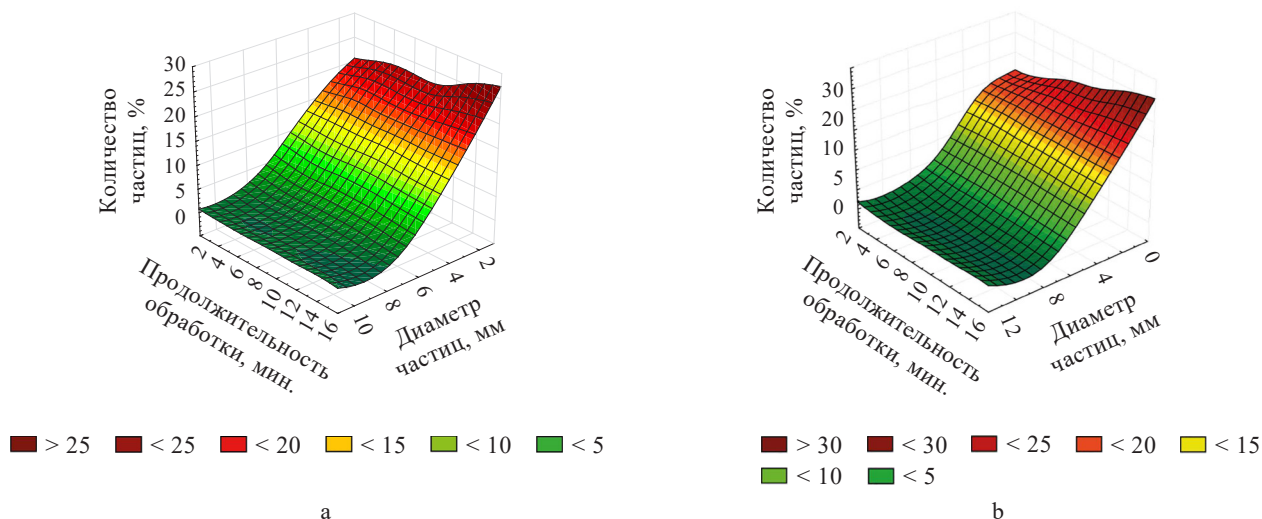


Рисунок 1. Графики поверхности отклика, показывающие влияние продолжительности ультразвукового воздействия при мощности 50 Вт на размер частиц флавоноидной фракции и их содержание в водной суспензии: а – концентрация 0,1 %; б – концентрация 0,5 %

Figure 1. Effect of ultrasonic treatment at 50W on flavonoid particle size and their content in aqueous suspension: a – 0.1%; b – 0.5%

и крайне низкой растворимостью в воде и этиловом спирте, что существенно ограничивает их применение в составе пищевых продуктов. Для повышения растворимости и равномерного распределения флавоноидов в пищевых матрицах рассмотрена их микронизация физическими методами. При ультразвуковом воздействии возникает эффект кавитации и происходит сверхтонкое диспергирование твердых частиц в жидкой системе, сопровождающееся быстрым увеличением температуры. Для предотвращения деградации флавоноидов температура процесса ограничена 60 °С [19].

Для преодоления барьерных факторов обеспечения эффективности микронизации флавоноидной фракции ранее проведены исследования при следующих режимах ультразвукового воздействия: частота $22 \pm 1,65$ кГц; интенсивность не менее 10 Вт/см²; мощность (номинальная) 15, 25, 38 и 50 Вт, продолжительность 3, 5, 10 и 15 мин. и показано, что между мощностью и содержанием твердых частиц флавоноидов существует прямая зависимость – с увеличением мощности ультразвукового воздействия увеличивается содержание мелких частиц в суспензии. Продолжительность ультразвукового воздействия в меньшей степени влияет

на процесс микронизации флавоноидов: при увеличении продолжительности в два раза, общее количество частиц увеличивается в среднем на 15–20 %, а при увеличении мощности в два раза – на 100 % и более, при прочих равных условиях [20]. С учетом технической возможности ультразвукового реактора, а также физического смысла исследуемых величин был определен рациональный режим микронизации в условиях ультразвукового воздействия: обработка в течение 10 мин. при мощности 50 Вт.

Одним из основных свойств микронутриента является растворимость в пищевых системах, которая зависит от его концентрации. В связи с этим для выявления оптимальной концентрации флавоноидов при рациональном режиме ультразвукового воздействия осуществлен процесс микронизации в водной суспензии концентрацией 0,1 и 0,5 % в объеме 200 см³. В результате серии экспериментов для рассматриваемых концентраций получены данные, которые обработаны методами математической статистики и представлены в виде графиков поверхности отклика (рис. 1).

В процессе ультразвукового воздействия микронизации, эффективность которой максимально выра-

жена в суспензии с концентрацией флавоноидов 0,5 %, наблюдается выравнивание размера частиц по всему объему. Диапазон размера частиц флавоноидов меняется от 6300 нм (контроль) до 1400 нм (ультразвуковое воздействие при мощности 50 Вт, 10 мин.), что отражают данные микроскопии (рис. 2).

На микрофотографиях рисунка 2 видно, что частицы флавоноидов представляют собой структуру изометрической формы (сфера, правильные многогранники), которая улучшает диспергируемость, увеличивает растворимость, физиологическую активность и другие свойства микронизированных частиц БАВ в водных средах.

Оценка влияния технологических параметров (температуры, мощности и продолжительности ультразвукового воздействия) на характеристики образующихся в результате микронизации частиц флавоноидов показала, что увеличение продолжительности воздействия от 3 до 15 мин. способствует уменьшению среднего диаметра частиц в 2,5 раза от 4000 нм до 1400 нм; повышение температуры воздействия в пределах одного временного интервала не оказывало значимого влияния на диаметр образующихся частиц, при этом минимальный размер был у частиц, полученных в результате УЗВ мощностью 50 Вт в течение 15 мин.

При выявлении оптимальных условий ультразвуковой обработки суспензий флавоноидной фракции для достижения значений параметров, дающих максимальное содержание частиц диаметром 1400 нм, спланирован и реализован полный факторный эксперимент. В качестве факторов варьирования приняты: X_1 – мощность, Вт; X_2 – концентрация, %; X_3 – продолжительность ультразвукового воздействия, мин. Критерий оптимизации Y – размер частиц диаметром 1400 нм.

Для данных факторов выбраны основные уровни и интервалы варьирования (табл. 3).

Для проверки гипотезы адекватности использован критерий Фишера:

$$F_p = \frac{S_{ao}^2}{S_y^2} \quad (1)$$

где F_p – расчетное значение критерия Фишера.

Табличное значение критерия Фишера (F_m) для заданного уровня значимости $\alpha = 0,05$. Так как $F_p < F_m$ ($2,732 < 3,010$), то гипотеза об адекватности модели принимается, т. е. модель адекватна.

Согласно проведенным расчетам выявлена зависимость содержания частиц диаметром 1400 нм (Y) от мощности, Вт (X_1); концентрации, % (X_2) и продолжительности микронизации в условиях ультразвукового воздействия, мин (X_3), которая описывается следующим уравнением регрессии:

$$Y = 15,48 + 5,9X_1 - 0,8X_2 + 2,7X_3 + 0,3X_{13} + X_{123} \quad (2)$$

На основе уравнения регрессии были построены поверхности отклика величины рассеивания частиц флавоноидной фракции размером 1400 нм и показано, что максимальное содержание частиц этого размера (21,3 %) наблюдается при продолжительности ультразвукового воздействия 10 мин. и мощности 50 Вт.

При криогенном измельчении в жидком азоте размольный стакан криомельницы осуществляет радиальные колебания в горизонтальной плоскости. Благодаря инерции движения размольные шары совершают удары с высокой кинетической энергией по твердым частицам вещества и измельчают его. Размольный стакан непре-

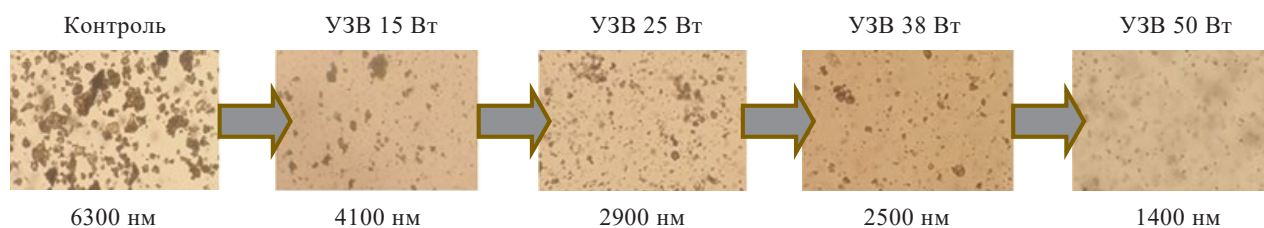


Рисунок 2. Динамика микроструктуры флавоноидной фракции в 0,5 % суспензии в зависимости от мощности ультразвукового воздействия продолжительностью 10 мин. ($\times 40$)

Figure 2. Microstructure of flavonoid fraction in 0.5% suspension: effect of different ultrasonic treatments, 10 min ($\times 40$)

Таблица 3. Значения уровней факторов и интервалов варьирования

Table 3. Values of factor levels and variation intervals

	Натуральные значения			Кодированные значения		
	Мощность, Вт	Концентрация, %	Продолжительность обработки, мин	X_1	X_2	X_3
Основной уровень	32,5	0,3	9	0	0	0
Интервал варьирования	17,5	0,2	6			
Нижний уровень	15	0,1	3	–1	–1	–1
Верхний уровень	50	0,5	15	+1	+1	+1

рывно охлаждается жидким азотом при помощи встроенной системы охлаждения, благодаря чему образец вещества охрупчивается с сохранением химической структуры и биологической активности. Продолжительность криогенного воздействия составила 3, 5, 10 и 15 мин. при концентрации водной суспензии флавоноидов 0,1 и 0,5 %.

Полученные экспериментальные данные обработаны методами математической статистики и представлены в виде поверхностей отклика на рисунке 3.

В процессе криогенного измельчения наблюдается выравнивание размера частиц флавоноидной фракции, а эффективность микронизации максимально выражена при криогенном измельчении в водной суспензии концентрацией 0,1 % продолжительностью воздействия 15 мин., что отражают данные микроскопии (рис. 4).

Согласно полученным данным, максимальное количество частиц диаметром 1200 нм и менее образуется при криогенном измельчении продолжительностью 15 мин. Несмотря на получение более мелких частиц, метод криогенного измельчения имеет ограничения

при реализации в производственных условиях (низкая производительность, сложность оборудования и высокая стоимость расходных материалов). На рисунке 5 показана диаграмма распределения частиц МОФФ ОШ по размерам при рациональных режимах ультразвукового воздействия и криогенного измельчения.

В экспериментальных образцах флавоноидной фракции определен химический состав, морфология, размер частиц и их распределение по размерам. Внешний вид и микрофотографии 0,5 % водных суспензий образцов приведены на рисунке 6.

Электронно-микроскопическое исследование показало, что в результате микронизации размер частиц фракции флавоноидов уменьшается с 6300 нм (контроль) до 1200 нм (образец 2) и 1400 нм (образец 3); частицы контрольного образца крупные, неправильной формы, собраны в ансамбли, в то время как частицы МОФФ ОШ имеют форму близкую к сферической и равномерно распределены по объему, что улучшает технологические свойства, а также консервирующую способность в составе различных пищевых систем.

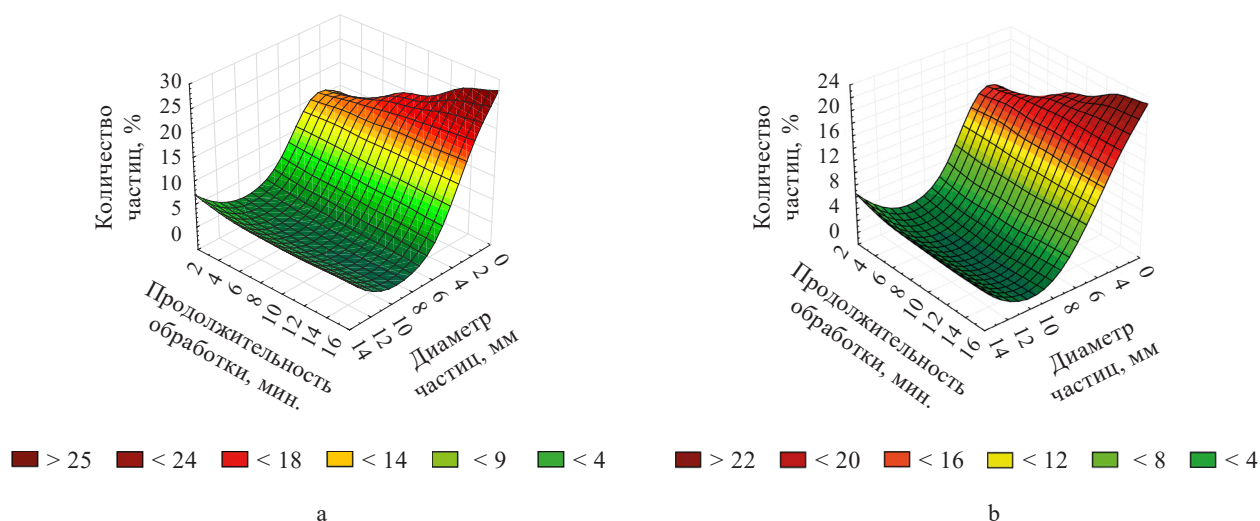


Рисунок 3. Графики поверхности отклика, показывающие влияние продолжительности криогенного измельчения на размер частиц флавоноидной фракции и их содержание в водной суспензии: а – концентрация 0,1 %; б – концентрация 0,5 %

Figure 3. Effect of cryogenic grinding time on flavonoid fraction particle size and content in aqueous suspension: a – 0.1%; b – 0.5%

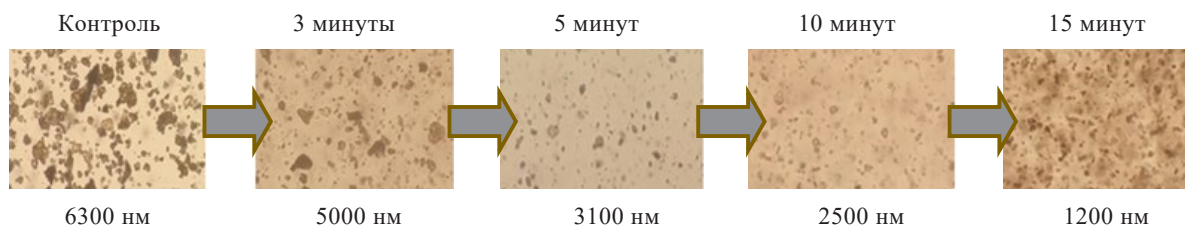


Рисунок 4. Динамика микроструктуры флавоноидной фракции в 0,1 % суспензии в зависимости от продолжительности криогенного измельчения (×40)

Figure 4. Microstructure of flavonoid fraction in 0.1% suspension: effect of different cryogenic grinding times (×40)

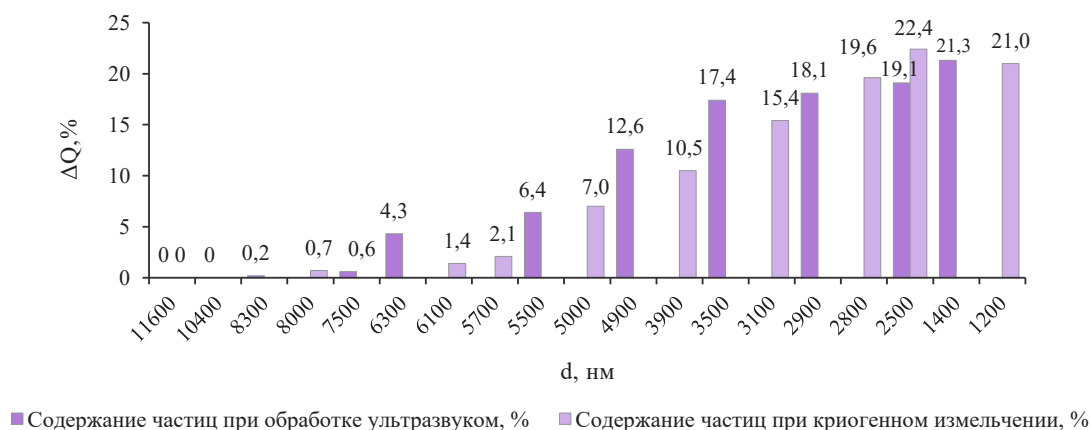


Рисунок 5. Диаграмма распределения частиц МОФФ ОШ по размерам при рациональных режимах микронизации
Figure 5. Purified flavonoid fraction of sea-buckthorn meal particles under rational micronization modes: size distribution

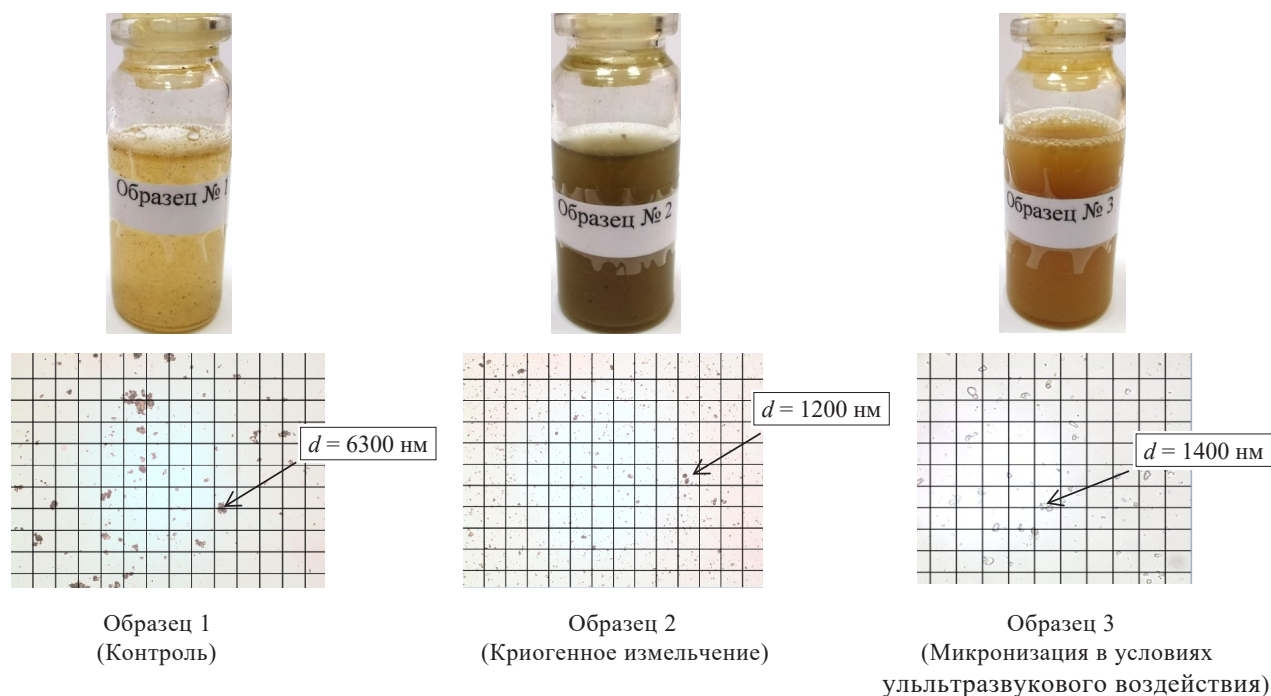


Рисунок 6. Внешний вид и микрофотографии водных суспензий образцов флавоноидной фракции концентрации 0,5 % ($\times 40$)
Figure 6. Appearance and microphotographs of aqueous suspensions of 0.5% flavonoid fraction ($\times 40$)

Дисперсный состав и распределение частиц по размерам в суспензиях образцов флавоноидной фракции приведены на рисунке 7.

Из гистограмм рисунка 7 следует, что наиболее узким диапазоном распределения частиц по размерам характеризуется образец 3, что свидетельствует о меньшем размерном «разбросе» частиц и эффективности микронизации в условиях ультразвукового воздействия в сравнении с криогенным измельчением.

Методом ВЭЖХ в составе образцов флавоноидной фракции обнаружены рутин, нарциссин, мирицетин,

кемпферол, кверцетин и изорамнетин в соотношениях, представленных в таблице 4.

Согласно данным таблицы 4 состав флавоноидной фракции в результате микронизации, независимо от способа, изменяется для мажорных соединений флавоноидной фракции – кверцетина и изорамнетина – незначительно.

По внешнему виду образцы флавоноидной фракции до и после микронизации представляют собой тонкодисперсный однородный порошок желто-коричневого цвета, полученный центрифугированием суспензии

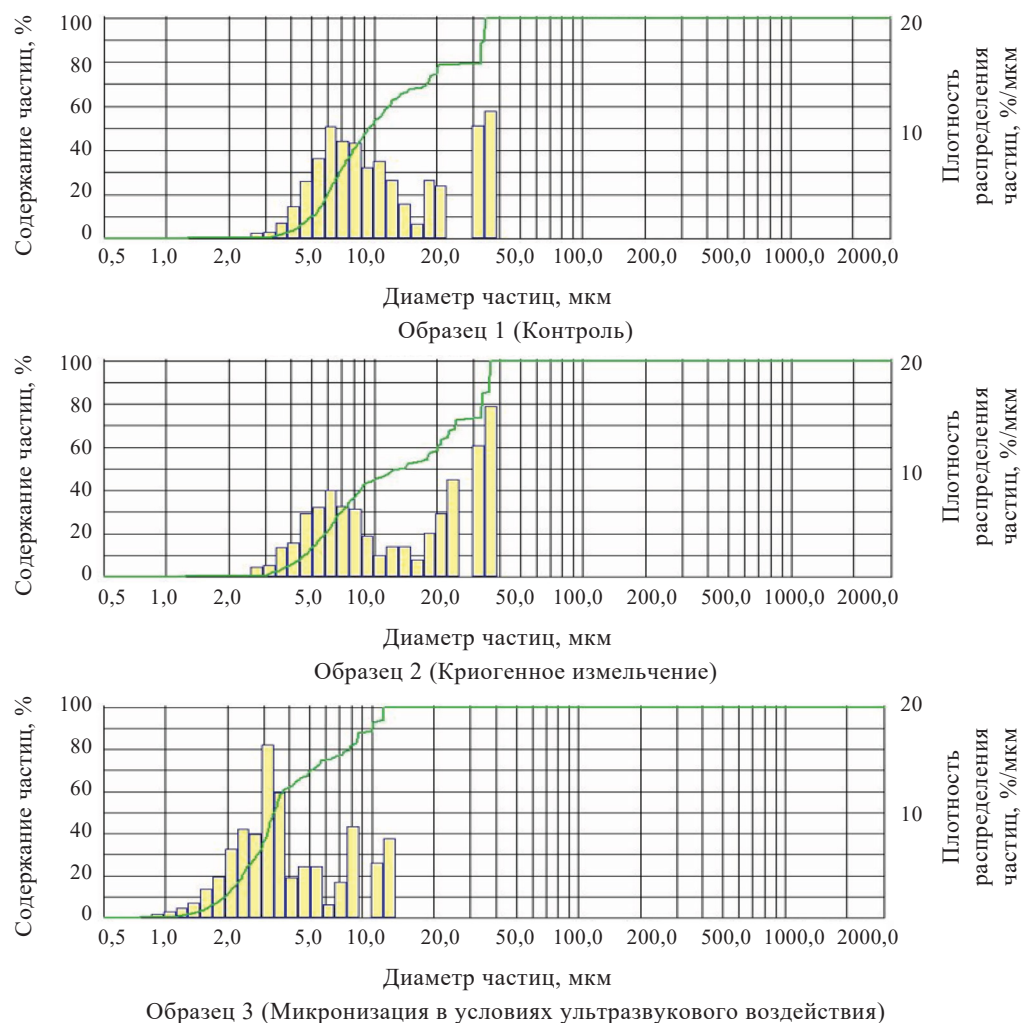


Рисунок 7. Дисперсный состав и распределение частиц по размерам суспензии образцов флавоноидной фракции, полученные методом электронной микроскопии

Figure 7. Disperse composition and particle size distribution of suspensions of flavonoid fraction samples: electron microscopy

Таблица 4. Содержание индивидуальных соединений в составе образцов флавоноидной фракции ($M \pm m$, $n = 3$), %

Table 4. Individual compounds in flavonoid fraction samples ($M \pm m$, $n = 3$), %

Соединение	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Рутин	$0,14 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
Кверцетин	$35,11 \pm 0,02$	$34,33 \pm 0,02$	$34,30 \pm 0,02$
Кемпферол	$1,72 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$
Изорамнетин	$62,12 \pm 0,02$	$64,14 \pm 0,02$	$64,20 \pm 0,02$
Нарциссин	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$
Мирицетин	$0,61 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$

при 15 000 об/мин. в течение 15 мин. с последующим высушиванием в сушильном шкафу при температуре 50 ± 5 °C до влажности порядка 3,5 %, при этом в результате микронизации в условиях ультразвукового воздействия порошок приобретает ярко выра-

женный желтый оттенок и менее выраженный цвет с сероватым оттенком в результате криоизмельчения. Образцы не имеют вкуса, запах слабовыраженный, свойственный плодам облепихи, посторонние примеси не обнаружены. Образцы, полученные в результате микронизации, характеризуются высоким содержанием основного вещества (суммы флавоноидов) – 96 %, зольность – 0,04 %, токсичные элементы и посторонняя микрофлора не обнаружены, что свидетельствует об их высоком качестве и безопасности.

Несмотря на близкие размерные характеристики получаемых частиц флавоноидной фракции и их компонентный состав, преимуществом ультразвуковой технологии микронизации является относительно простая конструкция излучателя ультразвуковых волн, простота обслуживания оборудования, отсутствие необходимости поддержания экстремально низких температур до -197 °C, что облегчает масштабирование процесса. В связи с этим дальнейшие исследования по растворимости и консервирующей способности

флавоноидной фракции проводились с образцом 3, полученным в результате микронизации в условиях ультразвукового воздействия.

Для достижения максимальной растворимости компонентов флавоноидной фракции рассмотрены зависимости растворимости от температуры и продолжительности растворения.

Наибольшая растворимость компонентов флавоноидной фракции в воде составляет: до микронизации –

74,52 мг/л, после микронизации – 77,62 мг/л и достигается при температуре растворения – 100 °С, продолжительности – 35 мин. Процесс микронизации позволяет увеличить растворимость в воде на 4,16 % (рис. 8).

Компоненты флавоноидной фракции плохо растворимы в подсолнечном масле: максимальная растворимость достигается при растворении МОФФ ОШ при температуре 100 °С в течение 35 мин. и составляет 1,38 мг/л (рис. 9).

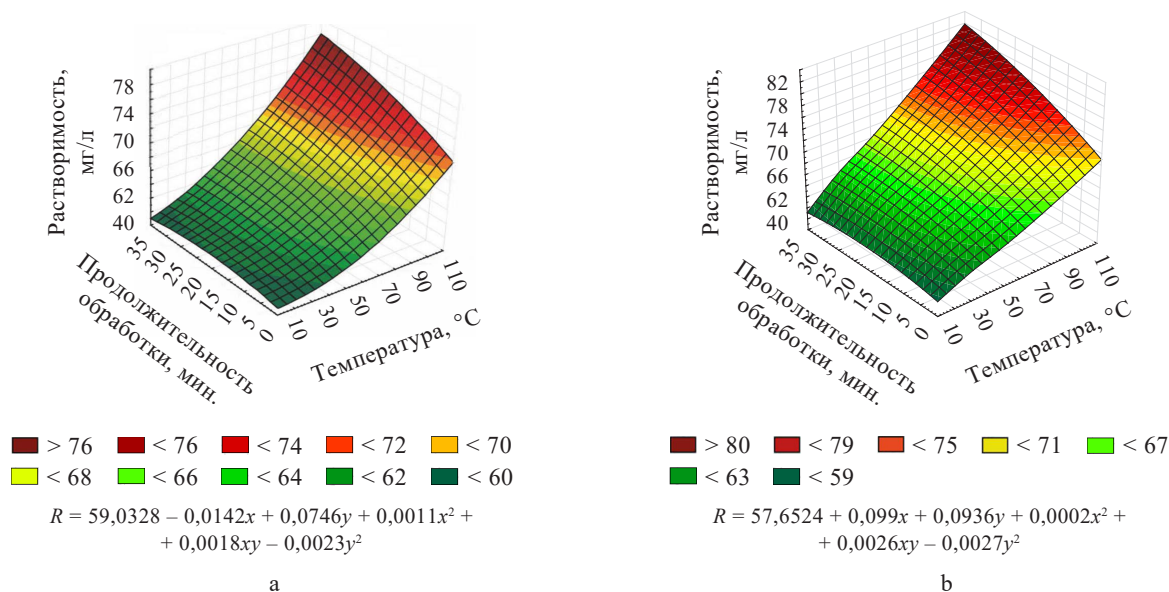


Рисунок 8. Графики поверхности отклика, показывающие влияние температуры и продолжительности растворения на растворимость компонентов флавоноидной фракции в воде

Figure 8. Effect of temperature and dissolution time on water solubility of flavonoid fraction components: a – Sample 1; b) – Sample 3

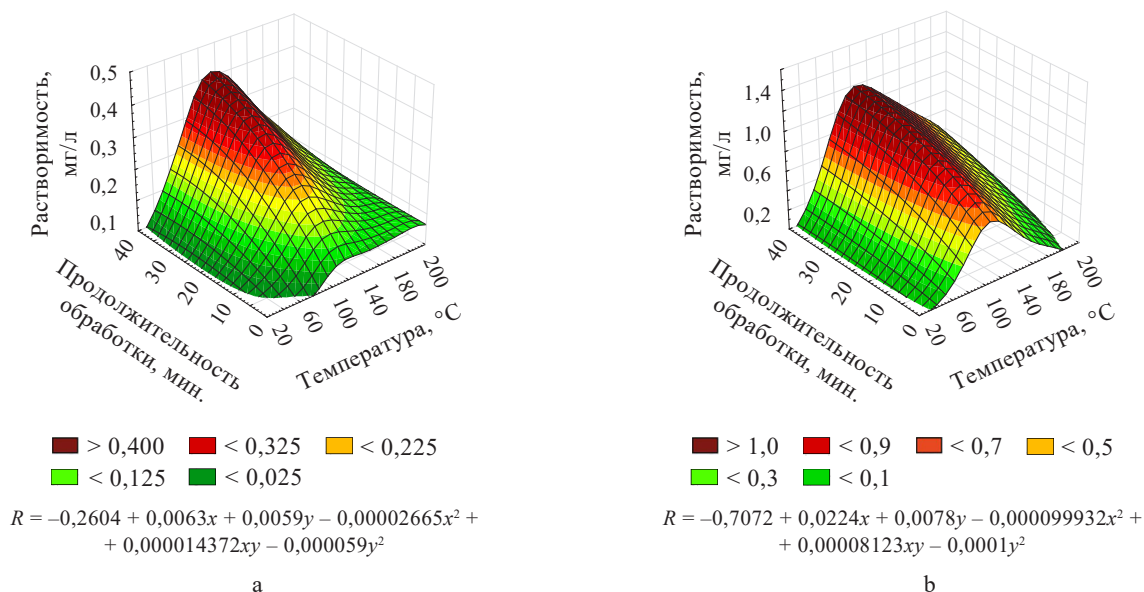


Рисунок 9. Графики поверхности отклика, показывающие влияние температуры и продолжительности растворения на растворимость компонентов флавоноидной фракции в подсолнечном масле: а – образец 1; б – образец 3

Figure 9. Effect of temperature and dissolution time on sunflower oil solubility of flavonoid fraction components: a – Sample 1; b – Sample 3

Наибольшая растворимость компонентов флавоноидной фракции наблюдается в спирте этиловом 96 % об. и составляет: до микронизации – 97,71 мг/л (температура растворения – 78 °С, продолжительность – 35 мин.), после микронизации – 100,43 мг/л (температура растворения – 40 °С, продолжительность – 30 мин.); процесс микронизации позволяет увеличить растворимость на 3 % (рис. 10); при этом растворимость компонентов флавоноидной фракции в спирте этиловом не зависит от температуры, но проявляет сильную зависимость от продолжительности растворения.

Таким образом, МОФФ ОШ имеет достаточно хорошую растворимость для минорных компонентов в пищевых растворителях, что позволяет рекомендовать ее в качестве пищевой добавки для использования в различных пищевых матрицах. Варьируя соотношение сред и другие условия, можно добиться максимальной растворимости компонентов в задан-

ных условиях. Микронизация положительно влияет на растворимость компонентов флавоноидной фракции как в полярных растворителях (вода, этиловый спирт), так и в неполярных (растительное масло), поэтому является одним важнейших этапов ее получения.

Доказательством эффективности микронизации являются результаты исследования антиоксидантной активности образцов флавоноидной фракции (табл. 5).

В результате микронизации образец МОФФ ОШ (образец 3) увеличивает скорость каталазной реакции – на 19 % по отношению к немикронизированному образцу (образец 1) при постоянстве скорости глутатионредуктозной реакции, что способствует увеличению антиоксидантной активности образца МОФФ ОШ в четыре раза.

При микробиологическом исследовании установлено, что образцы флавоноидной фракции обладают антимикробной (бактериостатической) активностью

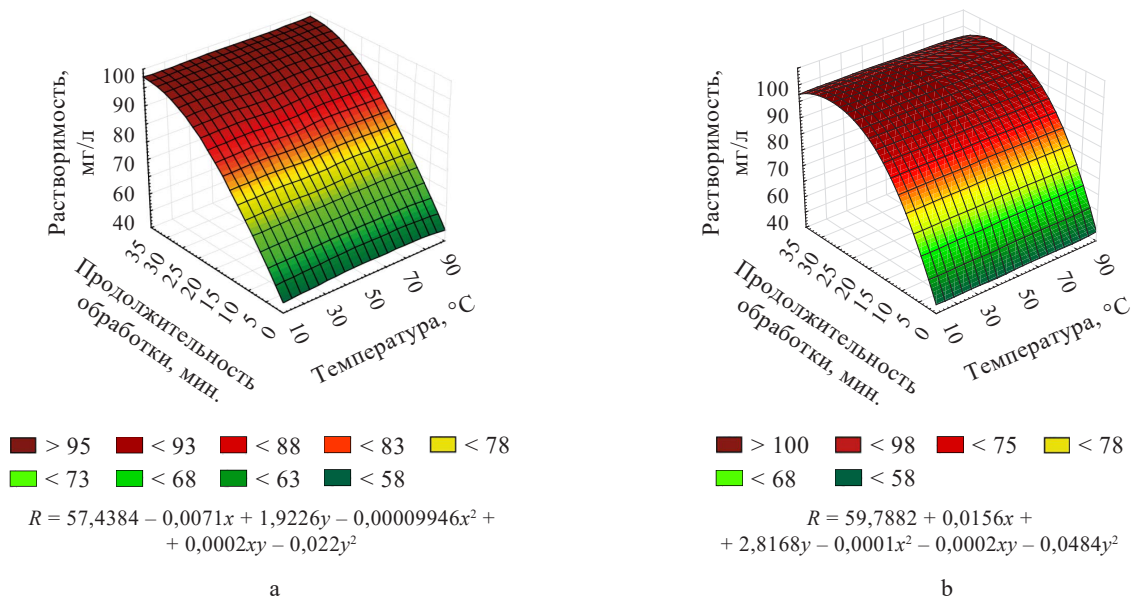


Рисунок 10. Графики поверхности отклика, показывающие влияние температуры и продолжительности растворения на растворимость компонентов флавоноидной фракции в этиловом спирте 96 % об.

Figure 10. Effect of temperature and dissolution time on 96%-ethyl solubility of flavonoid fraction components, a – Sample 1; b – Sample 3

Таблица 5. Антиоксидантная активность образцов флавоноидной фракции ($M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Table 5. Antioxidant activity of flavonoid fraction samples ($M \pm m$, $p \leq 0.05$)

Наименование показателя	Без флавоноидов	Образец 1	Образец 3
Антиоксидантная активность, мг/г	0	0,125	0,500
Скорость глутатионредуктазной реакции: – мкмоль/(мин на мг белка) – %	2,92 ± 0,06 100	4,41 ± 0,10 151*	4,35 ± 0,21 144*
Скорость каталазной реакции – мкмоль/(мин на мг белка) – %	1,50 ± 0,02 100	1,56 ± 0,02 104	1,85 ± 0,09 123*

* Значения достоверны при $p < 0,05$

Таблица 6. Антимикробная активность образцов флавоноидной фракции ($M \pm m$, $n = 3$), мкг/см³Table 6. Antimicrobial activity of flavonoid fraction samples ($M \pm m$, $n = 3$), $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

Штаммы микроорганизмов	Образец 1	Образец 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3000 $\pm$ 20	3000 $\pm$ 20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	2000 $\pm$ 20	2000 $\pm$ 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3000 $\pm$ 20	2000 $\pm$ 20
Дрожжеподобные грибы: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000 $\pm$ 10	1000 $\pm$ 10

в отношении грамотрицательных *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и грамположительных *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) бактерий, а также фунгистатической активностью в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231 в концентрациях 1000–3000 мкг/см³ (табл. 6).

Согласно данным таблицы 6 микронизация не оказывает существенного влияния на антимикробную активность флавоноидов облепихи в отношении условно-патогенной микрофлоры, за исключением синегнойной палочки (*P. aeruginosa*), необходимая концентрация флавоноидной фракции для проявления бактериостатического действия которой снизилась в 1,5 раза, что свидетельствует об увеличении эффективности МОФФ ОШ (образец 3) в отношении этого вида микроорганизмов.

Совокупность полученных результатов доказывает возможность использования МОФФ ОШ в различных пищевых системах в качестве натуральной пищевой добавки, выполняющей технологическую функцию консерванта.

Выводы

В результате экспериментальных исследований подобраны рациональные режимы микронизации очищенной флавоноидной фракции для дальнейшего использования в производственных процессах: при микронизации в условиях ультразвукового воздействия для получения частиц диаметром 1400 нм необходима обработка 0,5 % суспензии при наложении ультразвуковых колебаний мощностью 50 Вт в течение 10 мин.; при измельчении в шаровой криомельнице 0,1 % суспензии достижение размера частиц 1200 нм происходит за 15 мин. Несмотря на близкие размерные характеристики получаемых частиц, показаны эффективность и преимущества ультразвуковой технологии микронизации: относительно простая конструкция излучателя ультразвуковых волн, простота обслуживания оборудования, возможность масштабирования процесса, отсутствие необходимости поддержания экстремально низких температур (до -197°C) и получение суспензии с более высокой концентрацией флавоноидов 0,5 %.

Установили, что микронизация в условиях ультразвукового воздействия положительно влияет на растворимость компонентов флавоноидной фракции как в полярных растворителях (вода, этиловый спирт), так и в неполярных (растительное масло), поэтому является одним из важнейших этапов ее получения.

Доказали, что образцы очищенной флавоноидной фракции облепихового шрота обладают антимикробной (бактериостатической) активностью в отношении грамотрицательных *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и грамположительных *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) бактерий, фунгистатической активностью в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231 в концентрациях 1000–3000 мкг/см³. Микронизация не оказывает влияние на антимикробную активность флавоноидов облепихи в отношении условно-патогенной микрофлоры, за исключением синегнойной палочки (*P. aeruginosa*), необходимая концентрация очищенной флавоноидной фракции для проявления бактериостатического действия которой снизилась в 1,5 раза, что свидетельствует об увеличении эффективности микронизированного образца в отношении этого вида бактерий. В условиях ультразвукового воздействия образец флавоноидной фракции (образец 3) увеличивает скорость каталазной реакции на 19 % по отношению к немикронизированному образцу (образец 1), при постоянстве скорости глутатионредуктазной реакции, что способствует увеличению антиоксидантной активности микронизированного образца в четыре раза.

Таким образом, образец очищенной флавоноидной фракции облепихового шрота, полученный микронизацией в условиях ультразвукового воздействия, может быть рекомендован для использования в качестве природного консерванта в различных пищевых матрицах.

Критерии авторства

Е. В. Аверьянова – руководство исследованием, проведение экспериментального исследования и написание рукописи. М. Н. Школьников – разработка концепции и консультация в ходе эксперимента, написание и редактирование рукописи. Н. В. Павлова – обработка и анализ полученных данных. Е. Д. Рожнов – литературный обзор, оформление статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

E.V. Averyanova supervised the research, conducted the experiments, and wrote the manuscript. M.N. Shkolnikova developed the research concept, provided consultations during the experiment, and edited the manuscript.

N.V. Pavlova processing and analyzed the obtained data.
E.D. Rozhnov provided the literature review and designed the illustrations.

Conflict of interest
The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Moiseyak MB, Ilyashenko NG, Grishin AG. Microbiological safety in food production. Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education. 2022;(3):64–67. (In Russ.). https://doi.org/10.463930/27821714_2022_3_64; <https://elibrary.ru/WPCMJF>
2. Teshome E, Forsido SF, Rupasinghe HP, Olika Keyata E. Potentials of natural preservatives to enhance food safety and shelf life: a review. The Scientific World Journal. 2022;(1):9901018. <https://doi.org/10.1155/2022/9901018>
3. Batiha GES, Hussein DE, Algammal AM, George TT, Jeandet P, Al-Snafi AE, *et al.* Application of natural antimicrobials in food preservation: recent views. Food Control. 2021;126:108066. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108066>
4. Fenoglio D, Soto Madrid D, Alarcón Moyano J, Ferrario M, Guerrero S, Matiacevich S. Active food additive based on encapsulated yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract: effect of drying methods on the oxidative stability of a real food matrix (mayonnaise). Journal of Food Science and Technology. 2021;58:1574–1584. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04669-y>
5. Blagoveshchenskaya DB, Merzlyakov AS. Studying toxic properties of widespread modern preservatives. Journal of New Medical Technologies. 2011;18(2):501–502. (In Russ.). [Благовещенская Д. Б., Мерзляков А. С. Исследование токсических свойств распространенных современных консервантов // Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т. 18. № 2. С. 501–502.]. <https://elibrary.ru/OCYLJJ>
6. Samoylov AV, Suraeva NM, Zaytseva MV, Rachkova VP, Kurbanova MN, Petrov AN. Comparative assessment of sorbic and benzoic acid via express biotest. Foods and Raw Materials. 2020;8(1):125–133. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-125-133>; <https://elibrary.ru/PULKJG>
7. Prakash B, Singh PP, Gupta V, Raghuvansh TS. Essential oils as green promising alternatives to chemical preservatives for agri-food products: new insight into molecular mechanism, toxicity assessment, and safety profile. Food and Chemical Toxicology. 2024;183:114241. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114241>
8. Kumari PK, Akhila S, Rao YS, Devi BR. Alternative to artificial preservatives. Systematic Reviews in Pharmacy. 2019;10(1):99–102. <https://doi.org/10.5530/srp.2019.1.17>
9. Muthuvelu KS, Ethiraj B, Pramnik S, Raj NK, Venkataraman S, Rajendran DS, *et al.* Biopreservative technologies of food: an alternative to chemical preservation and recent developments. Food Science and Biotechnology. 2023;32:1337–1350. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01336-8>
10. Moo CL, Yang SK, Osman MA, Yuswan MH, Loh JY, Lim WM, *et al.* Antibacterial activity and mode of action of β -caryophyllene on. Polish Journal of Microbiology. 2020;69(1):49–54. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-007>
11. Corpuz MR. Phytochemical Screening and Antibacterial Properties of Indigenous Vegetables in Cagayan Valley, Philippines. LINKER: The Journal of Engineering Application. 2020;3(2):1–6.
12. Lee N-K, Paik H-D. Status, antimicrobial mechanism, and regulation of natural preservatives in livestock food systems. Korean Journal for Food Science of Animal Resource. 2016;36(4):547–557. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.547>
13. Bouarab Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019;99(4):1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
14. Shah MA, Mir SA. Plant extracts as food preservatives. In: Mir SA, Manickavasagan A, Shah MA, editors. Plant extracts: Applications in the food industry. Academic Press; 2022. pp. 127–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822475-5.00010-7>
15. Chen T, Zhang M, Bhandari B, Yang Z. Micronization and nanosizing of particles for an enhanced quality of food: a review. Critical reviews in food science and nutrition. 2018;58(6):993–1001. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1236238>
16. Averyanova EV, Shkolnikova MN, Malakhova AV, Rozhnov ED. Method for producing a complex of bioflavonoids from defatted sea-buckthorn extraction cake. Russia patent RU 2711728C1. 2019. [Способ получения комплекса биофлавоноидов из обезжиренного облепихового шрота: пат. 2711728C1 Рос. Федерация. № 2019126682 / Аверьянова Е. В. [и др.]; заявл. 22.08.2019; опубл. 21.01.2020. 9 с. Бюл. № 3.].
17. Mironov AN. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (In Russ.). [Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.].
18. Lupanova IA, Mizina PG, Martynchik IA, Rogozhnikova EP. Comparative study of the biological activity of plant tinctures. Russian Journal of Biopharmaceuticals. 2020;12(4):45–49. (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2020-12-4-45-49>; <https://elibrary.ru/ZVDLWZ>
19. Potoroko IYu, Uskova DG, Pajmulina AV, Bagale U. Ultrasound micronization of fucoidan vegetable ingredient for the use in food production technology. Bulletin of the South Ural State University. Series: Food and Biotechnology. 2019;7(1):58–70. (In Russ.). <https://doi.org/10.14529/food190107>; <https://elibrary.ru/YYIRMD>
20. Averyanova EV, Shkolnikova MN, Rozhnov ED. Technological Aspects of Improving the Efficiency of Phytocomposition Based on Sea Buckthorn Meal Flavonoids. KSTU News. 2023;(68):57–70. (In Russ.). <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2023-68-57-70>; <https://elibrary.ru/TRQBCV>