



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Aušrinė Bakanaitė**

**PROBIOTIKŲ *Lactobacillus plantarum* ĮKAPSULIAVIMO  
IR JŲ TAIKYMO KOSMETIKOJE TYRIMAI**

Baigiamasis magistro darbas

**Vadovas**

Lekt. dr. Odeta Baniukaitienė

Kaunas, 2017

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**  
**POLIMERŲ CHEMIJOS IR TECHNOLOGIJOS KATEDRA**

**PROBIOTIKŲ *Lactobacillus plantarum* ĮKAPSULIAVIMO  
IR JŲ TAIKYMO KOSMETIKOJE TYRIMAI**

Baigiamasis magistro darbas  
Taikomoji chemija (kodas 621F10003)

**Vadovas**

Lekt. dr. Odeta Baniukaitienė

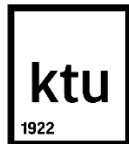
**Recenzentas**

Doc. dr. Aušra Šipailienė

**Darbą atliko**

Aušrinė Bakanaitė

Kaunas, 2017



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Aušrinė Bakanaitė

Studijų programa Taikomoji chemija (kodas 621F10003)

„Probiotikų *Lactobacillus plantarum* įkapsuliavimo ir jų taikymo kosmetikoje  
tyrimai“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20\_\_ m. \_\_\_\_\_ mėn. \_\_ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Aušrinė Bakanaitė** baigiamasis darbas tema „Probiotikų *Lactobacillus plantarum* įkapsuliavimo ir jų taikymo kosmetikoje tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

# TURINYS

SANTRAUKA.....	6
SUMMARY.....	7
SANTRUMPOS.....	8
IŽANGA .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1 Probiotikų įkapsuliavimui naudojamos medžiagos.....	11
1.1.1 Alginatas .....	11
1.1.2 Chitozanas .....	14
1.1.3 Celiuliozės acetato-ftalatas.....	16
1.1.4 Krakmolas .....	16
1.1.5 Želatina.....	17
1.1.6 Pieno baltymai.....	17
1.1.7 Pektinas .....	18
1.1.8 Gelanas ir ksantanas.....	19
1.1.9 Karageninas.....	20
1.2 Kapsuliavimo technologijos.....	22
1.3 Probiotikų vystymosi raida ir panaudojimas kosmetikoje .....	26
1.4 Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas .....	27
2. TYRIMAMS NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	29
2.1 Tyrimams naudotos medžiagos ir priemonės.....	29
2.2 Tyrimo metodai .....	33
2.2.1 Terpių ir tirpalų paruošimas .....	33
2.2.2 Bakterijų kultūros palaikymas ir auginimas skystoje mitybinėje terpėje.....	34
2.2.3 Bakterijų augimo kreivių nustatymas.....	34
2.2.4 Kapsulių gavimas ir liofilizacija .....	35
2.2.5 Bakterijų įkapsuliavimas.....	36
2.2.6 Kapsulių mechaninių savybių nustatymas .....	36
2.2.7 Makrokapsulių dydžio nustatymas.....	37
2.2.8 Skenuojančioji elektroninė mikroskopija ir mikroskopiniai tyrimai .....	37
2.2.9 Gyvybingų <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijų skaičiaus nustatymas .....	38
2.2.10 Bakterijų atsipalaidavimas ant odos paviršiaus, tepant kremą.....	40
2.2.11 Rankų kremo A/V gavimas .....	41

2.2.13 Standartinio nuokrypio skaičiavimas .....	42
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	43
3.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> augimo sąlygų tyrimai .....	43
3.2 Kapsulių gavimas .....	44
3.3 Makrokapsulių mechaninės savybės .....	45
3.4 Polimerų sąveika kapsulių formavimo metu .....	47
3.5 Makrokapsulių dydžio nustatymas .....	49
3.6 Liofilizuotų kapsulių morfologija .....	53
3.7 Bakterijų įkapsuliavimas .....	54
3.8 <i>Lactobacillus plantarum</i> gyvybingumas makrokapsulėse laikymo metu .....	56
3.9 Glicerolio stearato poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijoms .....	57
3.10 Cetearilo alkoholio poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijoms .....	58
3.11 Cetareth 20 poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijoms .....	59
3.12 Glicerolio poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijoms .....	61
3.13 Konservantų poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijoms .....	62
3.14 Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų <i>Lactobacillus plantarum</i> gyvybingumas laikymo kreme metu .....	66
3.15 Įkapsuliuotų <i>Lactobacillus plantarum</i> bakterijų atsipalaidavimas ir efektyvumas .....	67
IŠVADOS .....	69
PADEKA .....	70
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	71

Bakanaitė, Aušrinė. Probiotikų *Lactobacillus plantarum* įkapsuliavimo ir jų taikymo kosmetikoje tyrimai. *Taikomios chemijos magistro* baigiamasis darbas / vadovas lekt. dr. Odeta Baniukaitienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra.

Mokslo kryptis ir sritis: Fiziniai mokslai, chemija

Reikšminiai žodžiai: *probiotikai, įkapsuliavimas, kosmetika, Lactobacillus plantarum.*

Kaunas, 2017. 79 p.

## SANTRAUKA

Probiotikai vis plačiau naudojami kosmetikoje. Siekiant padidinti bakterijų gyvybingumą, jos įkapsuliuojamos polimerinėse matricose. Alginatas dėl savo unikalių savybių probiotikų įkapsuliavimui naudojamas jau daugelį metų. Tačiau iš alginato pagamintos kapsulės dažnai yra kietos ir tvirtos, o tai produktui suteikia nepageidaujamą smėlio tekstūrą. Todėl šio darbo tikslas – pagaminti kapsules, kurios savo savybėmis leistų kuo ilgiau ir efektyviau išsaugoti probiotinių bakterijų gyvybines funkcijas ir tiktų probiotinių bakterijų panaudojimui kosmetikoje.

Siekiant gauti skirtingos sudėties kapsules ekstruzijos būdu, buvo naudojami natrio alginato, pektino ir hidrosksietilceliuliozės polimerų tirpalai sumaišyti įvairiais santykiais.

Mechaninių savybių tyrimai parodė, kad didėjant hidrosksietilceliuliozės koncentracijai kapsulėse, mažėja jų kietumas. Pastebėta, kad visų rūšių kapsulių dydis po liofilizacijos sumažėjo ir neatsistatė brinkinant. Nustatyta, kad liofilizuotų kapsulių porų dydis siekia vidutiniškai 15–30 μm.

Tyrimai parodė, kad glicerolio stearatas, cetearilo alkoholis ir glicerolis nepasižymi antimikrobinu poveikiu prieš neįkapsuliuotas *Lactobacillus plantarum*. Tuo tarpu cetearith 20 įtaka grynai kultūrai yra stipresnė nei kitų emulsiklių. Stipriausiu antimikrobinu aktyvumu prieš tiriamąsias bakterijas pasižymėjo natūralūs konservantai – tai benzoinė rūgštis ir natrio benzoatas su gliukonolaktonu.

Nustatyta, kad įkapsuliavimas padidina probiotikų gyvybingumą, bet liofilizacija jį sumažina. Darbo metu buvo pagamintas kremas ir pienelis su probiotikais. Ištyrus neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumą kreme, pastebėta, kad įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas yra didesnis nei neįkapsuliuotų. Bakterijų atsipalaidavimo ant odos paviršiaus, tepant kremą, tyrimai parodė, kad daugiausiai probiotinių bakterijų atsipalaidavo iš kapsulių, kurių sudėtyje yra daugiausia hidrosksietilceliuliozės.

Bakanaitė, Aušrinė. *Encapsulation and Cosmetic Application of the Probiotic Lactobacillus plantarum*: Master's thesis in Applied chemistry / supervisor assoc. lekt. dr. Odeta Baniukaitienė. Department of Polymer Chemistry and Technology, The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Physical Sciences, Chemistry.

Key words: *probiotics, encapsulation, cosmetic, Lactobacillus plantarum*.

Kaunas, 2017. 79 p.

## SUMMARY

Probiotics are increasingly used in the cosmetics. In order to increase the viability of bacteria, they are encapsulated in polymer matrices. Alginate has been successfully used for many years for the entrapment of probiotics due to its unique properties. Nevertheless, alginates beads are solid and crumbly so this impairs the textural properties of products. The aim of this work is to produce capsules which properties would allow to maintain high viability of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and would be suitable for their application in the cosmetics.

In this study beads were obtained by extrusion technique using sodium alginate, pectin and hydroxyethylcellulose. Polymers were mixed in various ratios in order to get different samples.

The tests of mechanical properties showed that the hardness of capsules decreases with increasing hydroxyethylcellulose concentration in the capsules. It must be noted that the size of all kinds of beads has decreased after freeze-drying and didn't swell. The studies have shown that the average pore size of freeze-dried capsules was 15–30 μm.

It was examined that glyceryl stearate, cetearyl alcohol and glycerol had no antimicrobial effect against non-encapsulated *Lactobacillus plantarum*. Meanwhile, the influence of cetareth 20 on bacteria was stronger than other emulsifiers. The strongest antimicrobial effect against tested bacteria had natural preservatives – benzoic acid and sodium benzoate with gluconolactone.

It was observed that encapsulation increases the viability of probiotics while freeze-drying decreases it. In this research cream and lotion with probiotics were produced. The studies have shown that viability of encapsulated bacteria in cream was higher than non-encapsulated bacteria. Analysis of entrapped bacteria release revealed that capsules with higher amount of hydroxyethylcellulose demonstrated the greatest release.

## SANTRUMPOS

**G** – *L*-gulurono rūgštis

**M** – *D*-manurono rūgštis

*L. plantarum* – *Lactobacillus plantarum*

**V/A** emulsija – vandens aliejuje emulsija

**KSV** – kolonijas sudarantys vienetai

**HEC** – hidroksietilceliuliozė



## IŽANGA

Pastaruju metu probiotikų populiarumas tarp vartotojų labai padidėjęs, nes jie padeda pagerinti ir išlaikyti sveikatą. Dauguma komercinių probiotinių produktų yra skirti žmogaus virškinamojo trakto problemoms spręsti. Tačiau per pastaruosius kelerius metus probiotikų panaudojimo sritys išplito ir dabar jie plačiai naudojami maisto pramonėje, kosmetikos ir buitinės chemijos pramonėje, biotechnologijoje, farmacijoje. Ateityje viena iš naujausių probiotikų panaudojimo sričių galėtų būti psichinių ligų, ypač depresijos, gydymas ir profilaktika.

Probiotikų nauda žmogaus sveikatai yra akivaizdi. Jie pasižymi mitybiniu, fiziologiniu poveikiu, imunomoduliaciniu ir antimikrobinu veikimu. Nustatyta, kad probiotikai padeda apsisaugoti nuo kvėpavimo takų infekcijų, palaikyti normalią žarnyno mikroflorą, turi antikancerogeninį poveikį. Jie naudojami atkuriant žmogui naudingą odos mikroflorą, gydant dermatologines ir atopines ligas, randus ir nudegimus, apsaugai nuo UV spindulių, kaip odos senėjimą stabdanti priemonė. Probiotikai gali būti naudingi sergantiems maisto alergija, netoleruojantiems laktozės dėl laktazės stokos.

Visai neseniai probiotinėmis bakterijomis susidomėjo ir kosmetikos gamintojai, tačiau jie susidūrė su bakterijų išlaikymo problema, nes bakterijos yra jautrios aplinkos veiksniams. Todėl norint išlaikyti aukštą probiotinių bakterijų gyvybingumo lygį, būtina jas apsaugoti. Įrodyta, kad įkapsuliavimas ir imobilizavimas yra vieni iš efektyviausių būdų siekiant apsaugoti probiotikus nuo neigiamo aplinkos ar kontaktuojančių medžiagų, pvz.: konservantų, antimikrobinį poveikį turinčių ekstraktų, eterinių aliejų bei kitų kosmetikos gaminio komponentų, poveikio. Be to, kapsuliavimo sistemos geba probiotikus pristatyti į tikslinę vietą ir atpalaiduoti juos reikiamu laiku. Mokslinės literatūros apie probiotikų kapsuliavimo metodus yra nemažai, tačiau informacijos apie kapsuliuotų bakterijų gyvybingumą kosmetikos priemonėse trūksta. Todėl ne tik svarbu surasti efektyvų probiotikų įkapsuliavimo metodą, bet ir iširti įvairių kosmetikoje naudojamų komponentų poveikį probiotinių bakterijų gyvybingumui.

**Darbo tikslas** – pagaminti kapsules, kurios savo savybėmis leistų kuo ilgiau ir efektyviau išsaugoti probiotinių bakterijų gyvybines funkcijas ir tiktų probiotinių bakterijų panaudojimui kosmetikoje.

### **Darbo uždaviniai:**

- nustatyti *Lactobacillus plantarum* kultivavimo sąlygas;
- pagaminti skirtingos sudėties kapsules;

- ištirti kapsulių mechanines savybes, brinkumą;
- liofilizuoti kapsules ir ištirti liofilizuotų kapsulių savybes;
- optimaliausiomis savybėmis pasižyminčiose kapsulėse imobilizuoti probiotikus *L. plantarum*;
- įvertinti *L. plantarum* bakterijų gyvybingumą liofilizuotose ir neliofilizuotose kapsulėse laikymo metu;
- nustatyti neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų probiotikų (liofilizuotų ir neliofilizuotų) gyvybingumą pagrindiniuose kosmetikos preparatų komponentuose;
- pagaminti odos priežiūros preparatus ir ištirti neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumą juose;
- įvertinti bakterijų atsipalaidavimą ant odos tepant kremą su įkapsuliuotomis bakterijomis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Probiotikų įkapsuliavimui naudojamos medžiagos

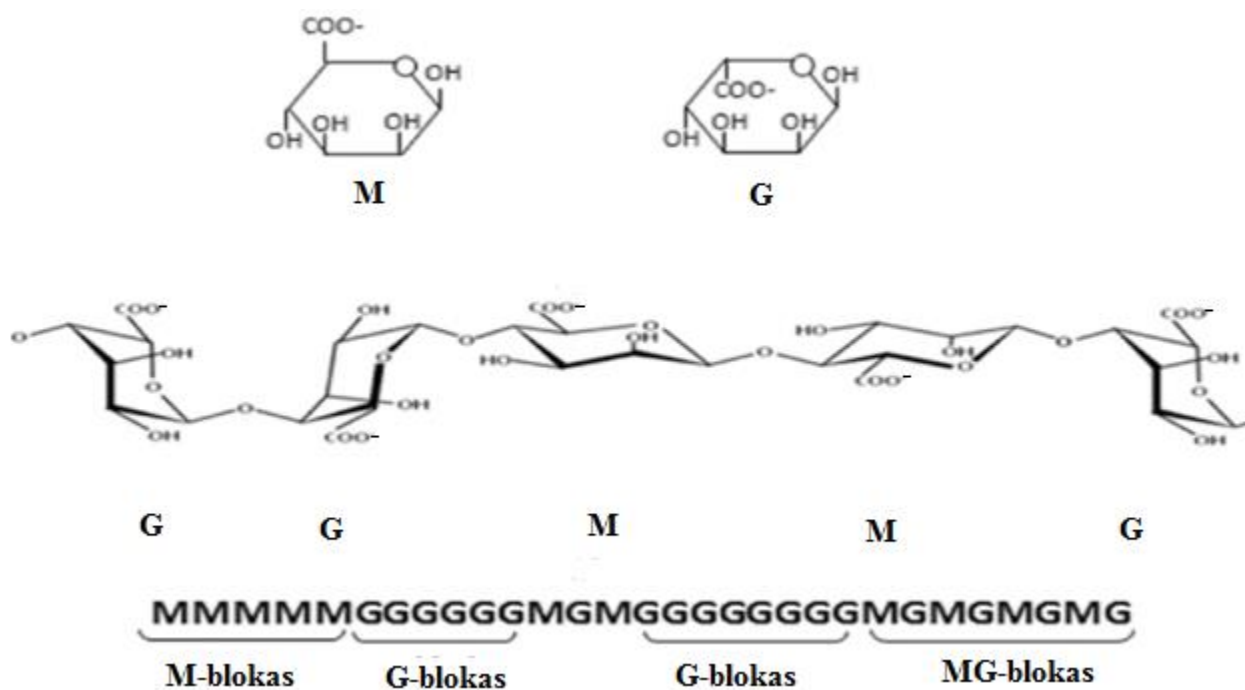
Biologinė medžiaga – tai bet kuri natūrali ar sintetinė medžiaga, turinti tiesioginį kontaktą su gyvomis ląstelėmis ir dalyvaujanti biologinėje sistemoje [1]. Probiotikų įkapsuliavimui naudojamos tiek natūralios, tiek sintetinės biologinės medžiagos [2]. Natūralūs ir sintetiniai polimerai, kurie tiesiogiai kontaktuoja su gyvomis ląstelėmis turi būti biosuderinami ir bioskaidūs [3]. Nors sintetiniai polimerai suteikia didesnę mechaninį stiprumą ir geresnę cheminį stabilumą, gamtiniai polimerai kapsulėms formuoti yra geresnė alternatyva nei sintetiniai [4]. Naudojant gamtinius polimerus gamybos procesas vykdomas švelnesnėmis sąlygomis, jis mažiau kenksmingas ląstelių gyvybingumui [4]. Be to, gamtiniai polimerai yra ekologiškos, nebrangios medžiagos, norint juos gauti nereikia atlikti sudėtingos cheminės sintezės, nes dauguma jų prieinami žaliavine forma iš natūralių šaltinių [5]. Biomedžiagos probiotikų kapsuliavimui parenkamos pagal fizikines ir chemines savybes, t. y. pagal cheminę sudėtį, morfologiją, mechaninį stiprumą, dalelių dydį, stabilumą virškinamajame trakte; taip pat įvertinant jų toksiškumą bei gamybos ir sterilizavimo procesų kaštus [1,6]. Siekiant padidinti ląstelių gyvybingumą gamybos proceso ir saugojimo metu, į polimerines matricas papildomai gali būti inkorporuoti krio- ir osmoprotektantai [3].

Įkapsuliavimo efektyvumas ir kapsulių stabilumas labai priklauso nuo įkapsuliuojančios medžiagos, kuri dažnai vadinama dengiamąja arba išorine medžiaga, membrana, lukštu, karkasu, apvalkalu, kapsule, pernešančia medžiaga, išorine faze ar matrica [2,7,8]. Dengiančios medžiagos turi pasižymėti tokiais savybėmis: jos turi stabilizuoti branduolio ingredientus, kontroliuoti atsipalaidavimą savitosiomis sąlygomis, būti inertiškos aktyviems komponentams, ekonomiškos, lanksčios, nehigroskopiškos, beskonės, stabilios, tirpios vandeniniuose tirpaluose ar tirpikliuose [1]. Taip pat jos turi būti mechaniškai stiprios, suderinamos su įkapsuliuojamomis medžiagomis, pasižymėti maža klampa, emulsinėmis ir plėveles formuojančiomis savybėmis [2]. Probiotinių ląstelių įkapsuliavimui naudojami įvairūs biopolimerai: alginatas, karageninas, želatina, pektinas, chitozanas, celiuliozės acetato-ftalatas, išrūgų ir pieno baltymai, krakmolas, ksantanas, gelanas [1,2]. Išsamesnė informacija apie kiekvieną polimerą pateikta kitame poskyryje.

### 1.1.1 Alginatas

Algino rūgštis ir alginatai (žr. 1.1 pav.) įkapsuliavimo tikslais pradėti naudoti 1980 metais. Nuo tada buvo atlikta daugybė alginatų taikymo tyrimų, todėl šiandien alginatas yra dažniausiai

naudojama medžiaga gyvų ląstelių įkapsuliavimui ir imobilizavimui. Alginatas yra polianijoninis polisacharidas, paprastai išgaunamas iš įvairių rūšių rudųjų jūros dumblių [9–11]. Taip pat jį gamina dviejų genčių bakterijos – pseudomonas ir azotą fiksuojančios bakterijos [11,12]. Natrio alginatas yra alginato rūgšties natrio druska [12]. Tai linijinis nešakotos grandinės blokinis kopolimeras, sudarytas iš  $\alpha$ -(1-4) ryšiais sujungtų *L*-gulurono rūgšties (G) bei  $\beta$ -(1-4) ryšiais sujungtų *D*-manurono rūgšties (M) likučių [2,5,10,11,13,14]. G ir M liekanos sudaro iš eilės einančius homopolimerinius G blokus (GG), iš eilės einančius homopolimerinius M blokus (MM) ir pakaitomis einančius mišrius M ir G blokus (GM) (žr. 1.1 pav.) [10]. Kiekvieno bloko ilgis, santykis tarp G ir M blokų yra kintantis ir priklauso nuo dumblių šaltinio, iš kurio yra išgaunamas [9–11]. Skirtingas G/M santykis lemia skirtingą mechaninį stabilumą [11,15] ir alginato technologinį panaudojimą [1,3].



1.1 pav. Alginato cheminės struktūros fragmentas [6]

Alginatas lengvai gelizuojasi esant nedideliame dvivalenčių katijonų, pvz.:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , kiekiui [9,10,13,16,17]. Vienvalenčiai ir  $\text{Mg}^{2+}$  jonai nesukelia gelizacijos. Sutinklinus  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  jonais gaunasi stipresni geliai nei su  $\text{Ca}^{2+}$ . Katijonai  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ir  $\text{Mn}^{2+}$  taip pat tinklina alginatą, bet dėl jų toksiškumo retai naudojami [12,19]. Nustatyta, kad tarpmolekuliniai skersiniai ryšiai daugiausia susidaro G blokuose [10,14]. Vieno polimero grandinės G blokai susijungia su gretimo polimero grandinės G blokais per dvivalenčius katijonus, tokiu būdu suformuodami trimatį tinklą, kuris dažnai vadinamas „kiaušinio–dėžutės“ struktūra [10,12,14,18].

Gelio kietumas priklauso nuo alginato *L*-gulurono rūgšties (G) grandžių kiekio [3]. G-rūgščių grandžių turtingas alginatas paprastai formuoja kietus ir trapius gelius [1,11], o daug M-rūgščių likučių turintis alginatas sudaro minkštus ir elastingus gelius [10].

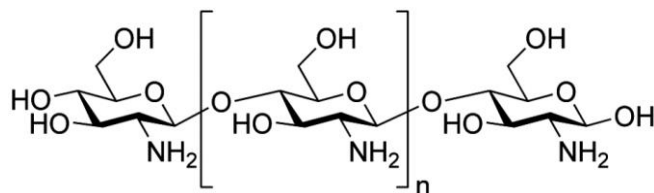
Natrio alginatas probiotikų įkapsuliavimui naudojamas dėl savo pigumo [2,6,7,9,14,19,20], naudojimo paprastumo [2,6,7,14,19,20], lengvo gelio matricų formavimo aplink bakterijų ląsteles [2,6,14], netoksiškumo [2,9,14,16,19,21,22], švelnių gamybos sąlygų [2,6], tinkamo ląstelių atpalaidavimo iš kapsulių [2], biologinio suderinamumo su kitomis medžiagomis [2,6,9,16,21,23]. Taip pat jis apsaugo veikliuosius komponentus, ląsteles ir daugiausia probiotinius mikroorganizmus nuo karščio, terpės pH, deguonies ir kitų veiksnių [23]. Kadangi alginatas yra natūralus polimeras, jis lengvai preinamas ir yra bioskaidus [9,12,16,21]. Pagal maisto ir vaistų administraciją (*angl.* FDA) alginato leistinoji paros dozė (LPD) yra nenurodyta, nes jis yra visuotinai pripažintas saugia medžiaga (*angl.* GRAS) [2,6,13,20]. Kadangi alginatas greitai sugeria vandenį [6,23], vandeniniame tirpale jis paprastai naudojamas kaip tirštiklis tirpalo klampai padidinti [10,23]. Alginato pKa vertė svyruoja tarp 3,20 ir 3,38 [18].

Alginatas jau kelis dešimtmečius plačiai naudojamas probiotikų įkapsuliavimui [13]. Jis ypač tinka pieno rūgšties bakterijoms įkapsuliuoti, nes labai padidina šių bakterijų gyvybingumą [6,20,23]. Į alginato gelio matricą galima įterpti 1–3 μm skersmens bakterijų ląsteles [6]. Dažniausiai probiotikų įkapsuliavimui naudojama alginato koncentracija yra nuo 0,5 iki 4 % [2,3,6,14]. Vis dėlto, alginatas turi keletą trūkumų. Visų pirma, jis yra jautrus rūgščiai terpei [3,6,7,14,17,19,22]. Greita drėgmės ir kitų skysčių difuzija per kapsulę sumažina jos barjerines savybes nuo nepalankių aplinkos faktorių [6,14]. Kapsulių dydis dažnai yra trūkumas, nes kalcio alginato granulės didesnės nei 1 mm, o tai gali sudaryti smėlio tekstūrą. Didelis kapsulių dydis taip pat gali riboti bakterijų atpalaidavimo greitį iš kapsulių [24]. Didžiausias trūkumas yra tai, kad alginatui būdingas didelis porų dydžio pasiskirstymas (5–200 nm) [2,11,25]. Didžiausiomis poromis pasižymi G grandimis turtingi alginatai [11]. Šis defektas gali būti kompensuojamas maišant alginatus su kitais polimeriniais junginiais, dengiant kapsules su priešingo ženklo krūvį turinčiais polimerais arba naudojant struktūriškai modifikuotą alginatą, kuris gaunamas pridėnant įvairių priedų [2,6,9,16,17,19]. Polikatijonai, pavyzdžiui, chitozanas arba poliamino rūgštys sumažina alginato gelio poringumą ir padidina kapsulių stabilumą [7,13,16,19,20,22,23]. Dėl elektrostatinės sąveikos tarp chitozано protonizuotų aminogrupių ir alginato karboksigrupių susiformuoja polielektrolitų komplekso mikrokapsulės membrana [21]. Įvairūs tyrimai parodė, kad pridėjus

krakmolo kaip užpildo į alginato kapsulių matricą, pagerėja probiotinių kultūrų gyvybingumas [6,19].

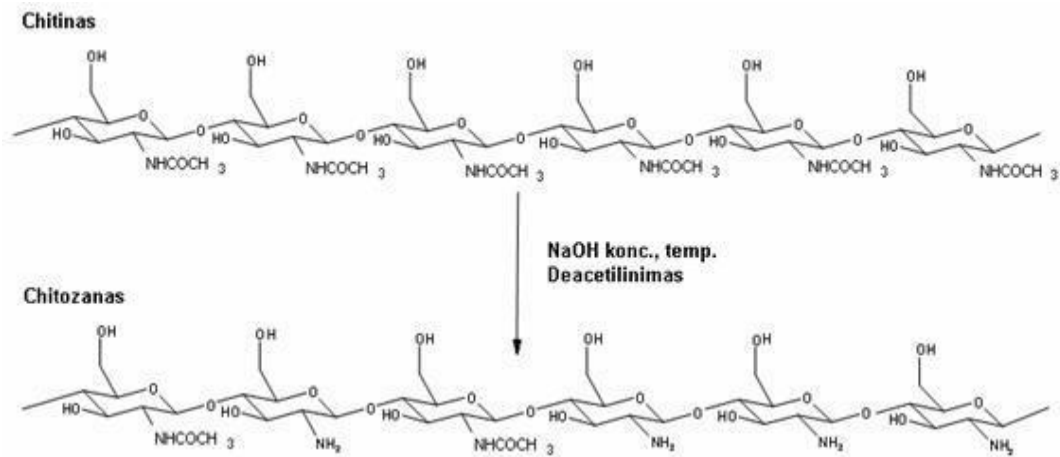
### 1.1.2 Chitozanas

Kitas natūralus polisacharidas naudojamas probiotikų įkapsuliavimui yra chitozanas (žr. 1.2 pav.). Chitozanas – tai teigiamą krūvį turintis linijinės struktūros polimeras [1,2,3,6,17]. Jis gaunamas chitino šarminio deacetilavimo metu (žr. 1.3 pav.) [2,3,6,14,15,16,17,26]. Chitiną sudaro pusiau kristalinės struktūros *N*-acetil- $\beta$ -*D*-gliukozamino grandinės [11]. Jis chemiškai panašus į kitą struktūrinį polisacharidą – celiuliozę, kurioje C-2 hidroksigrupė pakeista acetilamidogrupe. Biopolimeras chitinas išskiriamas iš daugelio natūralių rūšių kaip jų egzoskeleto struktūrinis komponentas [11,26]. Pagrindiniai chitino šaltiniai yra vėžiagyvių kiautai, vabzdžių odėlės, grybų membranos [2,3,6,14]. Komercinio chitino šaltiniais dažniausiai yra krabų ir krevečių lukštai. Norint gauti chitiną iš kriauklių, jį reikia apdoroti rūgštimi, kad ištirtų mineralai. Tada veikiant šarmu pašalinami baltymai ir hidrolizuojamos kai kurios acetilgrupės. Kai deacetilinta daugiau nei 75 % chitino acetilgrupių, medžiaga vadinama chitozanu [11]. Deacetilavimo laipsnis (DL) komerciniame chitozane svyruoja nuo 60 iki 100 %.



1.2 pav. Chitozano cheminės struktūros fragmentas

Galima teigti, kad chitozanas – tai kopolimeras, sudarytas iš dviejų monomerų 75–95 % gliukozamino ir 5–25 % *N*-acetil-*D*-gliukozamino vienetų, sujungtų  $\beta$ -1,4-glikozidinėmis jungtimis [3,15,19].



**1.3 pav.** Chitozano gavimas [11]

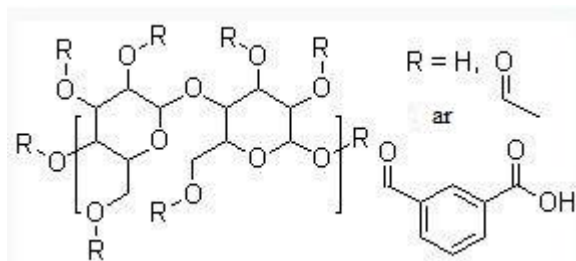
Chitozanas gali lengvai suformuoti polielektrolitų kompleksus su kitais polianijonais, pavyzdžiui, alginatu, pektinu, elastinu, ksantanu, karageninu ar net DNR [11,12]. Šis chitozano gebėjimas sudaryti kompleksus su polianijonais priklauso nuo deacetilimo laipsnio – kuo didesnis DL, tuo daugiau aminogrupių gali dalyvauti sudarant kompleksus [11].

Sutinklinus chitozaną joniniu ryšiu su polifosfatais ar natrio alginatu, pasiekiamas geresnis kapsulių stabilumas [2,6,14]. Lee ir kt. mokslininkai padarė išvadą, kad alginato kapsulės su chitozano danga yra veiksminga priemonė norint užtikrinti pienarūgščių bakterijų gyvybingumą šaldymo metu [2,15]. Chitozanas plačiai naudojamas kaip dengiamoji medžiaga kapsulėms dėl mažo toksinio poveikio, lengvos bioabsorbcijos bei geros bioskaidos [1,2,3,6,12,17,19,21,27]. Kadangi chitozanas pasižymi dideliu biosuderinamumu su gyvomis ląstelėmis ir gera adhezija prie gleivinės, jis labai tinka tiksliniam probiotikų atpalaidavimui tikslinėje vietoje [6,17,19,21]. Dėl gebėjimo formuoti plėveles ir didelio paplitimo gamtoje chitozanas taip pat plačiai naudojamas transportinių medžiagų paruošimui [27].

Nepaisant gerų chitozano savybių, jis pasižymi keliais trūkumais. Pirma, jis yra netirpus vandeniniuose tirpaluose, kurių pH reikšmė didesnė nei 6, o tirpus tik parūgštintuose tirpaluose [1,3,6,11,15]. Antra, chitozanas pasižymi antibakterinėmis savybėmis, o tai apriboja jo naudojimą kaip dengiamąją medžiagą bakterijų įkapsuliavimui [6]. Chitozanas gali būti chemiškai modifikuotas siekiant pagerinti jo tirpumą neutraliame pH arba sudarant kompleksus su kitais polimerais nesumažinant jo biologinio suderinamumo ir bioskaidumo [11].

### 1.1.3 Celiuliozės acetato-ftalatas

Dar viena plačiai naudojama dengiamoji medžiaga yra celiuliozės acetato-ftalatas (CAF) [6]. CAF struktūrą sudaro celiuliozės polimeras, kurio 50 % hidroksigrupių yra esterifikuotos acto rūgštimi ir 25 % grupių yra esterifikuotos viena ar dviem ftalio rūgšties grupėmis (žr. 1.4 pav.).

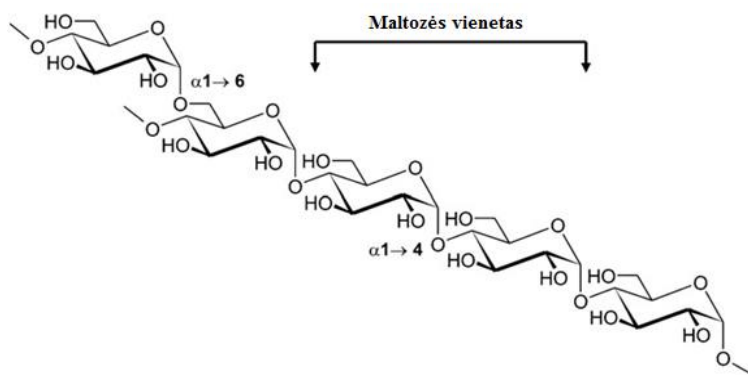


**1.4 pav.** Celiuliozės acetato-ftalato cheminės struktūros fragmentas [6]

Dėl saugios prigimties žmogaus organizmui ir atsparumo rūgštimis jis vartojamas kontroliuoti vaistų išsiskyrimą žarnyne [1,6]. Šio komponento pagrindinis privalumas yra tas, kad dėl jo jonizuotų ftalato grupių jis yra tirpus esant  $\text{pH} \geq 6$ , bet netirpus esant  $\text{pH} \leq 5$  [1,6]. Tokia savybė ypač palanki probiotikų įkapsuliavimui [6] siekiant, kad kapsulės nesuirėtų skrandyje.

### 1.1.4 Krakmolas

Probiotikų įkapsuliavimui dažnai naudojamas visuose žaliuosiuose augaluose randamas polisacharidas krakmolas [2]. Krakmolas sudarytas iš  $\alpha$ -D-gliukozės vienetų sujungtų glikozidinėmis jungtimis (žr. 1.5 pav.) [2,3,6]. Kaip ir chitozanas, krakmolas naudojamas kaip dengiamoji medžiaga alginato kapsulėms [3,6].



**1.5 pav.** Krakmolo cheminės struktūros fragmentas

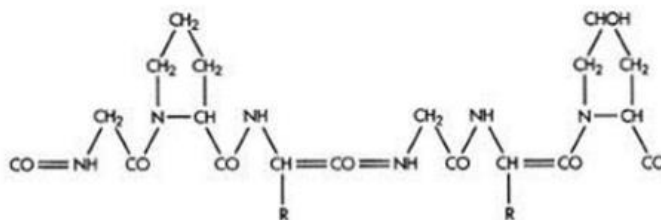
Įkapsuliavimui naudojamas trijų rūšių krakmolas: liofilizuotas grūdų krakmolas, modifikuotas krakmolas ir daug amilazės turintis krakmolas. Liofilizuotas grūdų krakmolas (*angl.* LCS)



naudojamas kapsulėms formuoti, tačiau kapsulės suyra veikiant kasos fermentams [3,6]. Tuo tarpu modifikuotas krakmolos (*angl.* RS) nėra suardomas kasos amilazės plonojoje žarnoje. Tokio krakmolo panaudojimas žymiai pagerina įkapsuliuotų probiotikų gyvybingumą [2,3,6]. Daug amilazės turintis kukurūzų krakmolos (*angl.* HACS) gali būti naudojamas norint pagerinti kapsulės ar apvalkalo/dangos formavimąsi [3,6]. Įrodyta, kad alginato ir krakmolo mišinys padidina skirtingų bakterinių ląstelių, ypač pieno rūgšties bakterijų, įkapsuliavimo efektyvumą [6].

### 1.1.5 Želatina

Želatina (*žr.* 1.6 pav.) yra heterogeninis vieno ar kelių polipeptidų likučių ir baltymų mišinys, pagamintas iš dalies hidrolizuojant kolageną, gaunamą ekstrahuojant jį iš gyvūnų odos ar kaulų [1,2,6]. Komercinė želatina skirstoma į dvi grupes: A ir B tipo [6].



1.6 pav. Želatinos cheminės struktūros fragmentas [6]

Probiotikų įkapsuliavimui želatina naudojama atskirai arba kartu su kitais polimerais [1,2,6]. Ji turi ypatingą struktūrą ir universalias funkcines savybes, pasižymi didele klampa vandenyje, sudaro termogrįžtamą gelį (geliu virsta aušinimo metu) [1,2,6,14]. Siekiant stabilizuoti gelį, makromolekulės tinklinamos glutaraldehidu arba chromo druskomis [1,2]. Želatinos amfoterinė prigimtis suteikia sinergistinį poveikį su anijoniniais polisacharidais, pavyzdžiui, gelanu [1,2,6,14]. Šie hidrokoloidai gerai maišosi, kai pH daugiau nei 6. Tačiau želatina įgauna teigiamą krūvį, kai pH reikšmė yra mažesnė nei izoelektrinio taško, o tai sukelia stiprią sąveiką su neigiamą krūvį turinčiu gelanu. Želatina naudojama kapsulėms gauti, taikant ekstruzijos technologiją arba gaminant V/A emulsiją [1,2].

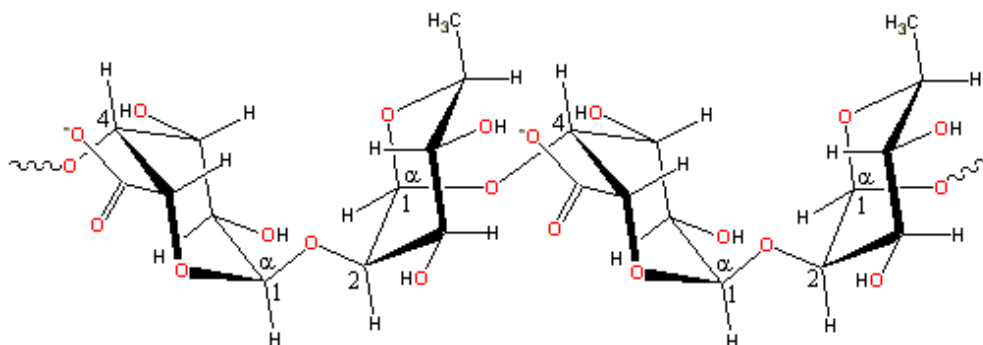
### 1.1.6 Pieno baltymai

Pieno baltymai yra labai įdomi įkapsuliavimo medžiaga dėl savo struktūros, fizikocheminių savybių ir biosuderinamumo. Kaip ir želatina, pieno baltymai pasižymi puikiais gelizuojančiomis savybėmis. Jie naudojami kaip natūralios transportinės medžiagos probiotikų ląstelėms [1,2]. Taip

pat labai populiarūs yra išrūgų baltymai, kurie naudojami kaip dangiamoji medžiaga, nes yra bioskaidūs. Išrūgų baltymai yra sferinių baltymų, išskirtų iš išrūgų, mišinys. Tai iš karvės pieno gaminamų sūrių šalutinis produktas. Skiriamos keturios pagrindinės baltymų klasės išrūgose: tai  $\beta$ -laktoglobulinas,  $\alpha$ -laktoalbuminas, serumo albuminas ir keletas immunoglobulinų. Dauguma šių baltymų yra sferinės konformacijos, jie jautrūs karščiui, aukštam slėgiui, nes šie veiksniai sukelia jų denatūraciją ir agregaciją [6]. Išrūgų baltymai gaunami ultrafiltracijos būdu, kurios metu mažos molekulinės masės junginiai, tokie kaip laktozė, mineralai, vitaminai ir azoto junginiai, pašalinami į permeatą, o baltymai sukonzentruojami retentate. Šie baltymai yra labai populiarūs dėl jų amfoterinio pobūdžio [1], plėvelę formuojančių savybių ir dažnai naudojami kaip apsauginė medžiaga purškiamojo džiovavimo metu, po kurio gaunamos vandenyje tirpios mikrokapsulių sistemos. Jie gali būti lengvai maišomi su neigiamą krūvį turinčiais polisacharidais, tokiais kaip alginatas, karageninas arba pektinas [6].

### 1.1.7 Pektinas

Pektinas (žr. 1.7 pav.) yra dar vienas natūralus polimeras naudojamas bakterijų įkapsuliuvimui. Tai pagrindinis aukštesniųjų augalų ląstelių sienelės komponentas, daugiausia išgaunamas iš citrusinių vaisių žievelių, cukrinių runkelių minkštimo ir obuolių išspaudų [6,15,24,25]. Būdinga pektino struktūra – tai linijinė grandinė, sudaryta iš  $\alpha$ -1,4-glikozidiniais ryšiais sujungtų didelio poli-*D*-galakturono rūgščių kiekio, kurios yra dalinai esterintos, prijungiant metoksigrupes. Jo sudėtyje taip pat yra neutralių angliavandenių, tokių kaip galaktozė, gliukozė, arabinozė, ksilozė ir *L*-ramnozė, kurie įterpti arba prijungti prie pagrindinės grandinės [6,15,18,25]. Pektino pKa vertė yra 2,9 [18].



1.7 pav. Pektino cheminės struktūros fragmentas

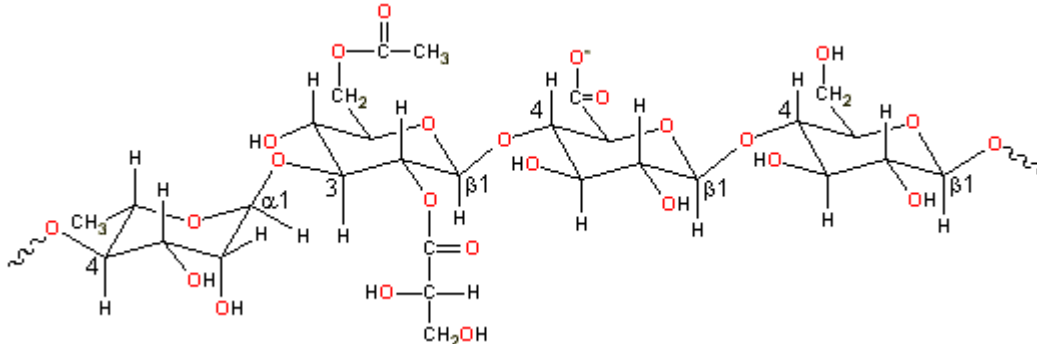
Šio anijoninio heteropolisacharido savybės iš esmės priklauso nuo eterinimo laipsnio [18,25]. Aukšto eterinimo (metoksilinimo) laipsnio (DE > 50%) pektinas, kuris išgaunamas iš citrusinių

vaisių ir obuolių išspaudų, sudaro gelius dėl vandenilinių ryšių ir hidrofobinės sąveikos tarp pektino molekulių, kai pH yra mažiau nei 3,5. Gelio sudarymui iš žemo eterinimo laipsnio pektino (DE < 50 %) reikalingi poli- ar divalenčiai katijonai, pavyzdžiui, kalcio jonai [6,24].

Pektinas vis dažniau naudojamas dėl savo didelio prieinamumo gamtoje, nedidelio toksiškumo ir, visų pirma, dėl stabilizuojančių, mukoadhezinių savybių, atsparumo proteazės ir amilazės poveikiui [18,24,25]. Rūgštinėje aplinkoje pektinas agreguojasi [24]. Dėl tokių savybių pektinas patraukli medžiaga įvairių junginių transportavimui [27]. Cukrinių runkelių pektinas (*angl.* SBP) pasižymi geromis emulsinėmis savybėmis [24]. Nemodifikuoto pektino taikymas yra ribotas dėl jo didelio tirpumo vandenyje. Daugeliu atvejų pektinas jungiamas kartu su katijonu arba kitu polimeru, pavyzdžiui, chitozanu, kad sudarytų lėtai skylančius kompleksus [15].

### 1.1.8 Gelanas ir ksantanas

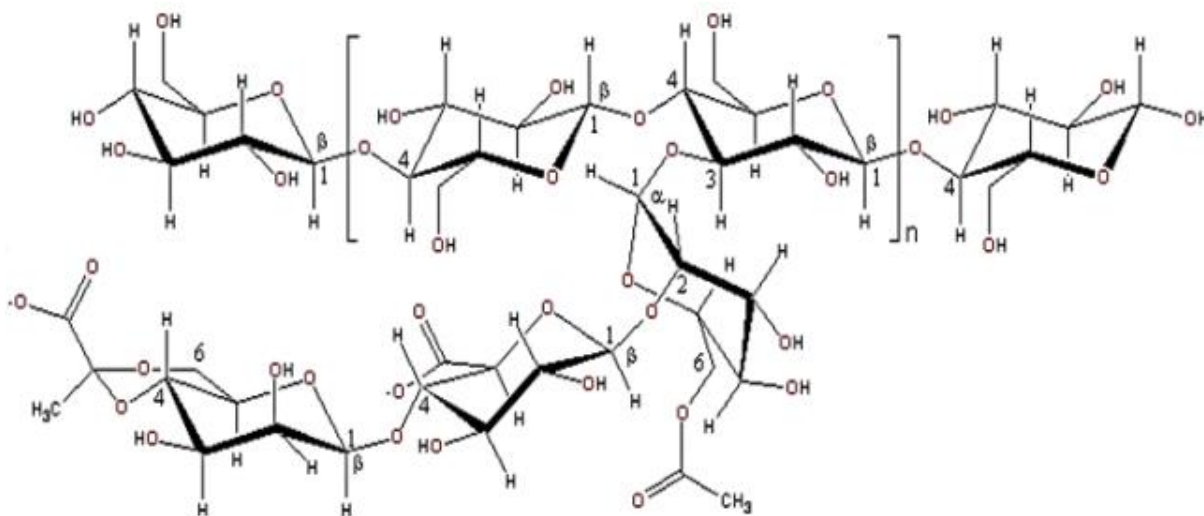
Probiotikų įkapsuliavimui naudojamos ksantanas ir gelanas. Gelanas (*žr.* 1.8 pav.) yra linijinis, anijoninis polisacharidas išskiriamas iš *Sphingomonas elodea* [3,11]. Jis sudarytas iš keturių pasikartojančių tetrasacharido vienetų: tai 1,3-β-D-gliukozės, 1,4-β-D-gliukurono rūgšties, 1,4-β-D-gliukozės ir 1,4-α-L-ramnozės [2,3,11].



1.8 pav. Gelano cheminės struktūros fragmentas

Gelanas sudaro termiškai grįžtamą gelį. Gelizacijos temperatūra priklauso nuo polimero koncentracijos, joninės jėgos ir krūvio tipo [2,12]. Gelanas egzistuoja dviejų izoformų: tai acilinta forma, kuri sudaro minkštus hidrogelius, ir deacetilinta forma, kuri sudaro kietus ir trapius gelius. Abi formos aukštoje temperatūroje yra spiralės konformacijos, kurios auštant pereina į dvigubos spiralės konformaciją. Stabilus hidrogelis gaunamas tirpale esant katijonams. Gelanas pasižymi biosuderinamumu su gyvomis ląstelėmis [11].

Nors iš gelano galima suformuoti kapsules, bet jis nelabai tinka šiam tikslui dėl aukštos gelizacijos temperatūros (80–90 °C apie 1 val.), kuri yra letalinė probiotinėms ląstelėms [2]. Todėl šis polisacharidas dažnai maišomas su kitu heteropolisacharidu – ksantanu, nes jų mišinys yra atsparus rūgštinėse sąlygose. Optimalus ksantano:gelano santykis yra 1:0,75 [3]. Naudojant ksantano-gelano mišinį probiotinėms ląstelėms įkapsuliuoti buvo pastebėtas didesnis atsparumas rūgštinėms sąlygoms nei naudojant alginatą [2].



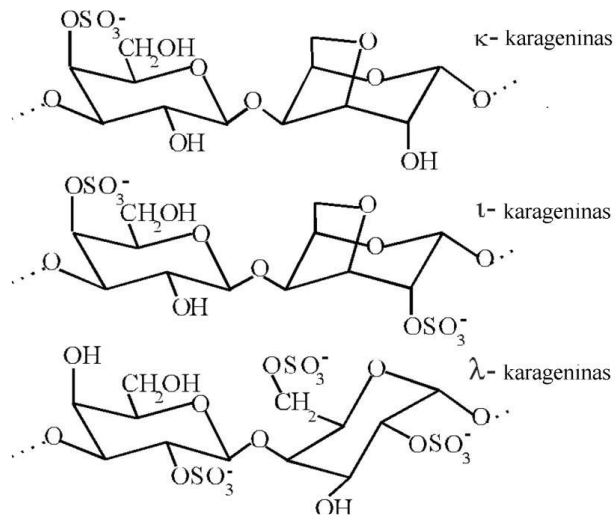
1.9 pav. Ksantano cheminės struktūros fragmentas [6]

Ksantanas (žr. 1.9 pav.) yra mikrobu gaminamas egzopolisacharidas, išskirtas iš *Xanthomonas campestris* [2,3]. Jis susideda iš celiuliozinių fragmentų su šoninėmis grandinėmis iš dviejų manozių ir vienos gliukurono rūgšties, kurios prijungtos prie kas antro gliukozės likučio [2,6]. Šoninės grandinės sudaro labai didelę ksantano molekulės dalį net 60 % [6]. Dėl šių šoninių grandinių polimeras tirpsta vandenyje [2,6]. Ksantanas stabilus plačiame temperatūrų ir pH diapazone. Jis plačiai naudojama maisto, farmacijos, kosmetikos ir naftos gręžimo pramonėje [6].

### 1.1.9 Karageninas

Ląstelių kapsuliavimui naudojamas natūralus polisacharidas karageninas dėl savo gebėjimo suformuoti gelį [1,2,3,6,28]. Karageninas gaunamas iš *Rhodophyceae* raudonųjų jūros dumblių šarminio ekstrahavimo metu [1,2,6,11,14,28]. Tai didelės molekulinės masės [6], linijinis, vandenyje tirpus, anijoninis, sulfogrupes turintis polisacharidas [11]. Karageninas, priklausomai nuo sulfogrupių padėties ir skaičiaus, yra skirstomas į kapa-(κ)-karageniną, jota-(ι)-karageniną ir lambda-(λ)-karageniną, turinčius vieną, dvi ir tris sulfogrupes, atitinkamai (žr. 1.10 pav.) [1,11]. Kapa-(κ)-karageninas sudarytas iš α-(1-3)-D-galaktozės-4-sulfato ir β-(1-4)-3,6-anhidro-D-

galaktozės; jota-(ι)-karageninas skiriasi nuo κ-karagenino papildoma sulfogrupe C-2 pozicijoje 1,4 ryšiu sujungtoje galaktozėje, o lambda-(λ)-karageninas turi trečią papildomą sulfogrupę C-6 pozicijoje toje pačioje 1,4 ryšiu sujungtoje galaktozėje [6].



**1.10 pav.** Karagenino cheminės struktūros fragmentas [6]

Vieną sulfogrupę turinčiame κ-karagenine ir dvi sulfogrupes turinčiame ι-karagenine yra 3 ir 6 D-galaktozės monomerai, sujungti deguonies tilteliu, kurie atsakingi už konformacinius perėjimus ir grįžtamą gelizaciją veikiant temperatūrai ir dalyvaujant katijonams [1,2,3,11]. Tris sulfogrupes turintis λ- karageninas gelio nesudaro [1,3,11]. κ- ir ι-karageninai tirpale yra spiralės konformacijos, kurios auštant tampa dvigubomis spiralėmis. λ-karagenine toks perėjimas nevyksta, nes didesnis sulfogrupių kiekis trukdo helikoidinės struktūros susiformavimui. Skirtingi karageninai formuoja skirtingus gelius – κ-karageninas sudaro stiprius ir standžius gelius, o ι-karageninas sudaro minkštus ir elastingus hidrogelius [11].

κ-Karageninas daugiausia naudojamas kaip tirštiklis, gelizuojanti medžiaga, tekstūros stipriklis ar stabilizatorius maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje [1,2,3,6,28]. Jis tirpinamas 60–80 °C temperatūroje [1,2,3,6,14]. Naudojant κ-karageniną įkapsulavimui ląstelių suspensija, šiuo atveju probiotikų, turi būti dedama į sterilų polimero tirpalą, įkaitintą iki 40–45 °C, nes kitu atveju gelis sukietėja kambario temperatūroje [2,3,6]. Karagenino kapsulės gali būti pagamintos naudojant ekstruzijos ir emulsijos metodus [1,2,6]. κ-Karageninas gali būti gelizuojamas jam reaguojant su vienvalenčiais katijonais (pvz.: kalio) [2,3,6]. Nors įkapsuliuotos probiotinės ląstelės κ-karagenino kapsulėse išlieka gyvybingos, tačiau gauti geliai yra trapūs, o naudojamas KCl priedas slopina kai kurių pieno rūgšties bakterijų, tokių kaip *Streptococcus thermophilus* ir *L. delbrueckii ssp* augimą [1,2,3,6].

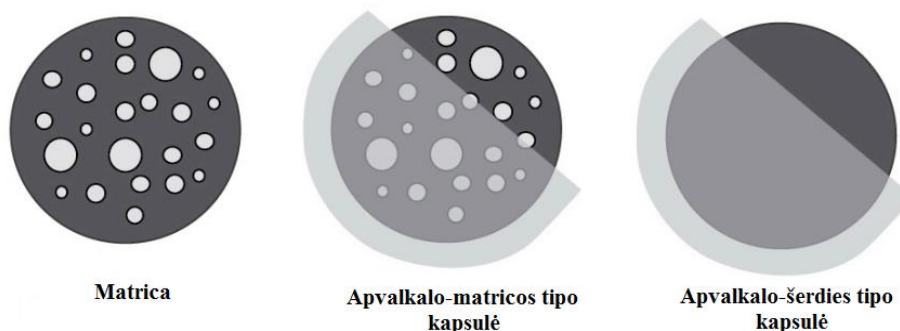
## 1.2 Kapsuliavimo technologijos

Naudingą poveikį suteikianti kasdieninė probiotikų dozė svyruoja nuo  $10^8$  iki  $10^9$  KSV  $g^{-1}$ . JAV Maisto ir Vaistų Administracijos rekomenduojama minimali probiotinių ląstelių koncentraciją yra  $10^6$  KSV mililitre arba viename grame [29]. Tačiau iki šiol nėra nustatytų vienodų probiotikų terapinių dozavimo vartojimo rekomendacijų. Priklausomai nuo klinikinio tikslo, probiotikų genties, rūšies ar padermės dozės svyruoja nuo  $10^7$  KSV iki  $10^{12}$  KSV per dieną [30,31].

Probiotikų vartojimas yra atsvara mikrofloros antagonistams, tokiems kaip sterilaus maisto vartojimas, padidėjusi higiena, stresas, antibiotikai, tačiau probiotiniuose preparatuose gyvybingumo išlaikymas vis dar yra sudėtingas, nes mikroorganizmai turi išgyventi pramoninių gamybinių procesų, saugojimo ir vartojimo metu [3,30,31,32,33,34]. Todėl įkapsuliavimas yra geriausias būdas apsaugoti probiotikus ir tokiu būdu padidinti jų kiekį veikimo vietoje. Įkapsuliavimas – sparčiai auganti tyrimų tema. Mokslininkai jau yra atradę daugybę kapsuliavimo technologijų. Dažnai geresniam rezultatui pasiekti naudojamas net kelių technologijų derinys [30].

Gaunamų kapsulių morfologija (žr. 1.11 pav.) ir dydis priklauso nuo kapsuliavimo technologijos ir naudojamų medžiagų. Probiotikų kapsuliavimui tinkamos medžiagos apertos 1.1 poskyryje. Pagal kapsulių dydį, įkapsuliavimo metodai skirstomi į du tipus: makrokapsuliavimą, kai makrokapsulių dydis yra nuo kelių milimetrų iki kelių centimetrų, ir mikrokapsuliavimą, kai mikrokapsulių dydis yra nuo 1 iki 1000  $\mu m$  [4,35,36].

Skiriami trys kapsulių tipai (žr. 1.11 pav.): tai matricos, kuriose yra disperguotos veikliosios medžiagos; apvalkalo-matricos tipo kapsulės, kurios gaunamos padengus matricą hidrofobine danga, ir apvalkalo-šerdies tipo kapsulės, kurių šerdis (vidinė fazė) apgaubta apvalkalo (išorinės fazės) [3,30,37,38].



1.11 pav. Kapsulių tipai [30]

Bakterijų imobilizavimas – tai jų patalpinimas įvairių karkasų viduje, o įkapsuliavimas – tai bakterijų padengimas išoriniu sluoksniu. Įkapsuliavimo privalumas yra tame, kad maisto medžiagos ir metabolitai gali lengvai difunduoti per kapsulę dengiančią ploną plėvelę. Tuo tarpu imobilizavimo atveju yra priešingai – bakterijas imobilizavus kietoje ar gelinėje matricoje medžiagų difuzija yra apribota [4,39–42].

1.1 lentelėje pateikiami kiekvienos daugiausiai naudojamos probiotikų kapsuliavimui technologijos privalumai ir trūkumai, dažniausiai vartojamos kapsuliavimo medžiagos bei gaunamų kapsulių dydis [30].

**1.1 lentelė.** Kapsuliavimo technologijos

Kapsuliavimo technologija	Kapsulių dydis	Kapsuliavimo medžiagos	Privalumai	Trūkumai
<b>Purkštuvinis džiovinimas</b> ( <i>angl.</i> spray drying)	Nuo 5 iki 150 μm	Inulinas, akacijos derva, saldžiosios ceratonijos dervos, krakmolai, sojos baltymai, išrūgų baltymai, liesas pienas, chitozanas, alginatas [3,38]	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tinka masinei gamybai.</li> <li>2. Nuolatinis procesas [3,34,38].</li> <li>3. Medžiagų monodispersiškumas.</li> <li>4. Naudojamas maisto pramonėje ir kitur [38].</li> <li>5. Nebrangus metodas [3,42,43].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ląstelių gyvybingumo sumažėjimas dėl aukštos temperatūros ir didelio slėgio [3,34,38,43,44].</li> <li>2. Dažniausiai naudojamos vandeninės suspensijos, t.y. apvaskalo medžiaga turėtų būti tirpi vandenyje [38].</li> <li>3. Sunku išlaikyti stabilumą saugojimo metu [43].</li> </ol>
<b>Purkštuvinis aušinimas</b> ( <i>angl.</i> spray cooling)	Nuo 20 iki 200 μm	Kakavos sviestas, palmių aliejus, palmių branduolių aliejus	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Masinė gamyba.</li> <li>2. Nuolatinis procesas.</li> <li>3. Pigi technika.</li> <li>4. Dėl žemesnių temperatūrų tinka termojautriems mikroorganizmams.</li> <li>5. Dėl naudojamų aliejų kapsulės dažnai netirpios vandenyje [43].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mažesnė apkrova (10–20 %) nei purkštuviniame džiovinime (5–50%).</li> <li>2. Įkapsuluota medžiaga gali būti paviršiuje ir kontaktuoti su aplinka (matricos sferos).</li> <li>3. Sunku prailginti tirpaus vandenyje ingrediento atsipalaidavimą daugiau nei 30 min.</li> </ol>

## 1.1 lentelės tęsinys.

Kapsuliavimo technologija	Kapsulių dydis	Kapsuliavimo medžiagos	Privalumai	Trūkumai
<b>Liofilizavimas</b> ( <i>angl. freeze drying</i> )	–	Kraskmolai, sojos baltymai, kazeinas, išrūgų baltymai, liesas pienas [38]	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Puikiai išdžiovintos medžiagos.</li> <li>2. Plačios pritaikymo galimybės.</li> <li>3. Tinkamas metodas jautrioms medžiagoms, kaip pavyzdžiui, probiotikams [38].</li> <li>4. Išvengiama vandeninės fazės perėjimo ir oksidacinio poveikio [43].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Labai brangus metodas [38,43].</li> <li>2. Jei nebus padaryta teisingai, gali susiformuoti kristalai ir pažeidžiamos ląstelės [3,34].</li> <li>3. Reikalingi krioprotektantai [3,34,43,44].</li> <li>4. Stabilumą išlaiko tik saugojimo metu [3,43].</li> <li>5. Ilgas procesas [38].</li> </ol>
<b>Purkštuvinis padengimas</b> ( <i>angl. spray coating</i> )	Nuo 5 µm iki 1 mm	Šelakas, kazeinas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontroliuojamas atsipalaidavimas naudojant skirtingas dangas.</li> <li>2. Stabilumo padidėjimas saugojimo metu.</li> <li>3. Ekonomiška technika.</li> <li>4. Didelis pralaidumas.</li> <li>5. Tinka pramoninei gamybai [43].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gali atsirasti jėgos, kurios gali pakenkti ląstelėms.</li> <li>2. Nors temperatūra yra mažesnė, poveikis gali būti ilgesnis veikiant deguoniui.</li> </ol>
<b>Emulsifikavimas</b> ( <i>angl. emulsification</i> )	Nuo 200 nm iki 1 mm [29]	Inulinas, karageninas [3,34,43,45], alginatas [29,34], krakmolo/alginato mišinys [29,34,43], celiuliozės acetato-ftalatas [3,34].	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Paprasta technika.</li> <li>2. Dažnai aukštas bakterijų gyvybingumo laipsnis.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Palyginus brangus metodas [35].</li> <li>2. Medžiagos polidispersiškumas [43].</li> <li>3. Sunku kontroliuoti dalelių dydį ir formą.</li> <li>4. Užsitęsiosios šlyties jėgos gali pažeisti ląsteles.</li> <li>5. Organinių tirpiklių toksiškumas [4].</li> </ol>



## 1.1 lentelės tęsinys.

Kapsuliavimo technologija	Kapsulių dydis	Kapsuliavimo medžiagos	Privalumai	Trūkumai
<b>Liposomos</b> ( <i>angl.</i> liposomes)	Nuo kelių nm iki kelių $\mu\text{m}$	Fosfolipidai	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gera apsauga jautrioms medžiagoms.</li> <li>2. Gali pernešti hidrofobines ir hidrofilines molekules vienu metu.</li> <li>3. Mukoadhezinės savybės.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Brangus ir sudėtingas metodas.</li> <li>2. Reikalingi organiniai tirpikliai.</li> <li>3. Kompozicijos yra praskiesti vandeniniai tirpalai.</li> <li>4. Nestabilūs aukštoje ir kambario temperatūroje, rūgštiniame pH.</li> </ol>
<b>Koacervacija</b> ( <i>angl.</i> coacervation)	Nuo $1\mu\text{m}$ iki 1 mm	Pektinas, želatina	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Didelė naudingoji apkrova (iki 99 %).</li> <li>2. Lengvos paruošimo sąlygos (kambario temperatūra).</li> <li>3. Apvalkalo vientisumas.</li> <li>4. Kontroliuojamas vidinės fazės atpalaidavimas [3,4].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Brangi technologija [3,4].</li> <li>2. Dažnai naudojami maistui netinkamos tinklinančios medžiagos ar fermentai, kurie yra neefektyvūs.</li> <li>3. Sunki kokybės kontrolė dėl skirtumų polisacharidų struktūrose.</li> </ol>
<b>Ekstruzija</b> ( <i>angl.</i> extrusion)	Nuo 100 $\mu\text{m}$ iki 3 mm [3]	Želatina, karageninas [3], saldžiosios ceratonijos derva, pektinas, cikorijos, cukriniai runkeliai, išrūgų baltymai [34], gelanas, ksantanas, chitozanas [43], alginatas [3,34,43].	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Monodispersiškumas.</li> <li>2. Pigus ir paprastas metodas [3,32,34,45].</li> <li>3. Lengvos paruošimo sąlygos, tinka anaerobams ir aerobams [3,32,34].</li> <li>4. Nuolatinis procesas.</li> <li>5. Nekenksmingas ląstelėms [3].</li> <li>6. Suteikia aukštą probiotikų gyvybingumą [3,34].</li> <li>7. Nereikalingi organiniai tirpikliai [3,34].</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dažnai toliau naudojamos kitos technologijos gauti galutinai sausoms medžiagoms.</li> <li>2. Didelės kapsulės [3,45].</li> <li>3. Netinka pramonei gamybai dėl lėto kapsulių formavimosi [3]</li> </ol>

Galima teigti, jog įvairios įkapsuliavimo ar imobilizavimo technologijos gali padidinti probiotinių bakterijų gyvybingumą, suteikti joms didesnę stabilumą ir atsparumą išorės veiksniams. Siekiant panaudoti kosmetikoje, labai svarbu įvertinti įvairių kosmetikos komponentų įtaką mikroorganizmams bei ištirti įkapsuliuotų bakterijų atsipalaidavimą iš sistemos.

### 1.3 Probiotikų vystymosi raida ir panaudojimas kosmetikoje

Terminas „probiotikai“ kilęs iš lotyniško žodžio „pro“ ir graikiško žodžio „bios“, kurių reikšmė yra „skirtas gyvenimui“ [46]. Probiotikų istorija vystosi paraleliai su žmonijos evoliucija ir šiuo metu nustatytas probiotikų vartojimas net prieš 10 000 metų. Pavyzdžiui, romėnų gamtininkas Plinijus Vyresnysis, rekomendavo gerti fermentuotą pieną žarnyno ligoms gydyti. Taip pat probiotikų terminas minimas Biblijoje ir šventose induizmo knygose [47].

Probiotikų era prasidėjo XX amžiaus pradžioje, kai rusų mokslininkas Ilja Mečnikovas, dirbęs Pastero institute Paryžiuje, pastebėjo, jog Bulgarijos gyventojų ilgaamžiškumas susijęs su dideliu suvartojamo fermentuoto pieno kiekiu [48]. Jis spėjo, kad fermentuotuose pieno produktuose esančios pieno rūgšties bakterijos turi senėjimą stabdančių savybių. 1908 metais I. Mečnikovas gavo Nobelio premiją už indėlį medicinos srityje. Jis nustatė, kad mikroorganizmai gali būti naudingi žmogaus sveikatai, kadangi normalizuoja žarnyno mikroflorą, t. y. kenksmingus mikroorganizmus pakeičia geraisiais. Mečnikovą galima vadinti „probiotikų tėvu“. Tačiau yra daugybė kitų mokslininkų prisidėjusių prie termino „probiotikai“ apibūdinimo, kaip pavyzdžiui, Kollath (1953 m.), Lilly ir Stillwell (1965 m.), Parker (1974 m.), Fuller (1989 m.) ir kiti [47]. Šiuo metu plačiai vartojamą probiotikų terminą apibrėžė pasaulinė sveikatos organizacija (*angl.* WHO) ir Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (*angl.* FAO) 2001 metais. Pasak jų, probiotikai – tai gyvi mikroorganizmai, kurie, vartojami atitinkamais kiekiais, yra naudingi vartotojo sveikatai [46,47,49,50]. Dažniausiai naudojami probiotikai – tai bakterijos, mielės ir virusai, kurie matomi tik per mikroskopą.

Paskutiniu metu atkreipiamas vis didesnis dėmesys į probiotinių bakterijų naudą kosmetikos priemonėse atkuriant žmogui naudingą odos mikroflorą. Šiuo metu prekyboje gausu drėkiklių, valiklių, kremų, losjonų, muilų ir kitų priemonių su probiotikais. Pavyzdžiui, Vokietijos gamintojas „CLR“ savo produkcijai naudoja probiotinių bakterijų lizatus [51]. Visai neseniai probiotikai pradėti naudoti ir burnos priežiūros priemonėse, pavyzdžiui, jų dedama į dantų pastas nuo ėduonies, kadangi probiotikai veikia slopinančiai prieš *Streptococcus mutans*, kurie ir sukelia dantų ėduonį.

Taip pat nustatyta, kad naudojant dantų valymui persinę salvadorą kartu su *Lactobacillus rhamnosus* ypač sumažėja *Streptococcus mutans* kiekis seilėse [49].

Mokslinės ir patentinės literatūros apie probiotikų naudą gana nemažai. L'Oreal kompanija užpatentavo (US 7651680 B2) metodą ir kosmetikos preparatus su bifidobakterijomis, kurios skirtos gydyti jautriai ir sausai odai [52]. Taip pat ši kompanija užpatentavo (US 20110014248 A1) kosmetikos priemonę su probiotikais, skirtą galvos pleiskanų gydymui [53]. Patente WO 2010013179 A1 aprašomas probiotinių mikroorganizmų ar jų frakcijų, ar metabolitų panaudojimas kosmetikos kompozicijose, kurios skirtos riebios odos gydymui [54]. Autoriai Castiel ir Gueniche nustatė, kad kosmetikos priemonė, turinti sudėtyje bent vieną iš *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium* rūšių, gali būti naudojama sausos, jautrios, paraudusios, į aknę linkusios odos gydymui [54]. Straipsnyje [55] pažymima, kad *Lactobacillus* ekstraktas (5 %) buvo veiksmingas mažinant odos paraudimus. Jis taip pat gali būti naudojamas gydyti esant lengvai aknės formai. O'Neill ir McBain patentinėje paraiškoje WO 2015181534 A1 aprašo probiotinių bakterijų lizatų panaudojimą odos regeneracijai ir odos barjero atkūrimui [54]. Taip pat probiotikų *Bifidobacterium* rūšių lizato panaudojimas kūno kvapo gydymui minimas patentinėje paraiškoje WO2011132176 A1 [56]. Patente US 8481299 B2 pažymima probiotikų nauda odos dirginimo mažinimui [57], o patente EP1322318 B1 [58] skelbiamas probiotinių pieno rūgšties bakterijų panaudojimas odos apsaugai nuo ultravioletinės spinduliuotės.

Probiotinės bakterijos jau yra įtrauktos į tarptautinės kosmetikos ingredientų nomenklatūros INCI (*angl.* International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) reglamentą. Firma MakingCosmetics gamina ingredientą vadinamą *Bacillus Ferment*, kurį pagal INCI sudaro fermentuotas keratinazės tirpalas, konservantas nipastat, metilparabenas, kalio sorbatas, CAS No 9014-01-1 [59].

#### **1.4 Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas**

Iš literatūros apžvalgos matyti, kad probiotikai pasižymi teigiamu poveikiu ne tik virškinamajam traktui, bet ir žmogaus odos mikroflorai. Dėl šių savybių pradėta gaminti kosmetikos preparatus, praturtintus gerosiomis bakterijomis. Tačiau labai sunku kosmetikos kompozicijose probiotines bakterijas išlaikyti gyvybingas. Todėl siekiant didesnio bakterijų stabilumo ir atsparumo išorės veiksniams, bakterijos yra įkapsuliuojamos ar imobilizuojamos įvairiais metodais. Šiuo metu yra daugybė įvairių probiotikų įkapsuliuavimo ir imobilizavimo metodų, kuriuose naudojamos nekenksmingos gerosioms bakterijoms biomedžiagos, pvz.: alginatas, chitozanas, pektinas ir kitos.

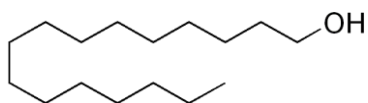
Naudojant tokius metodus galima padidinti probiotinių bakterijų gyvybingumą ir apsaugoti jas nuo kosmetikoje naudojamų konservantų antimikrobinio poveikio. Todėl šio darbo tikslas – pagaminti kapsules, kurios savo savybėmis leistų kuo ilgiau ir efektyviau išsaugoti probiotinių bakterijų gyvybines funkcijas ir tiktų probiotinių bakterijų taikymui kosmetikoje.

## 2. TYRIMAMS NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

### 2.1 Tyrimams naudotos medžiagos ir priemonės

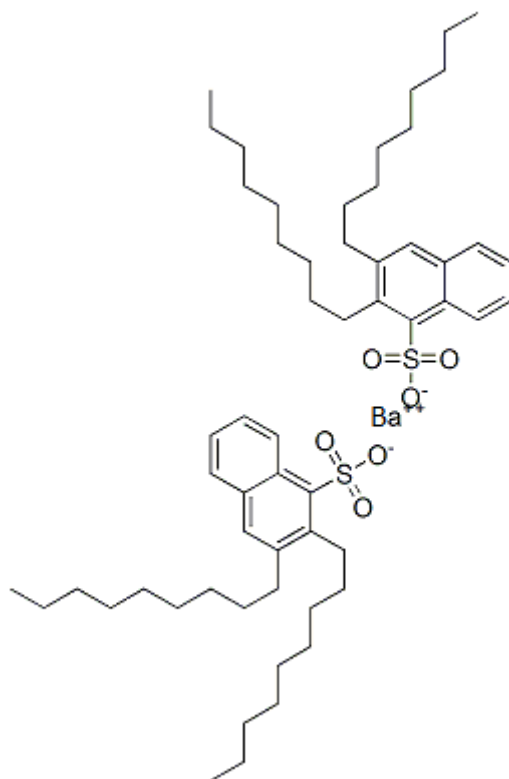
Šiame darbe tyrimams atlikti buvo naudotos medžiagos:

- Cetearilo alkoholis (2.1) – emulsiklis, minkštiklis, tiekėjas – BASF (Vokietija);



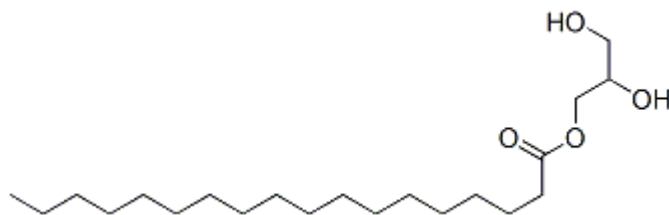
(2.1)

- Mineralinis aliejus (2.2), tiekėjas – Laboratorium Galenowe Olsztyn Sp. z o.o. (Lenkija);



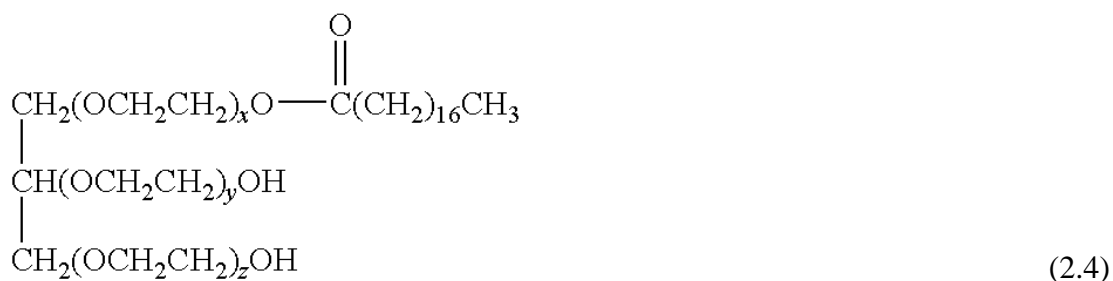
(2.2)

- Glicerolio stearatas (2.3). Emulsiklis, minkštiklis, pirktas iš BASF (Vokietija);



(2.3)

- Cetareth 20 (2.4) – cetilo/stearilo alkoholių polioksietileno eteris, nejoninis emulsiklis, tiekėjas BASF (Vokietija);



- Glicerolis (2.5), kurio grynumas 99,5 %, tiekējas – Reachem (Slovākija);



- Benzoinē rūgštis (2.6) – konservantas, tiekējas – Merck KGaA (Vokietija);



- Sensicare M 4200 – konservantas, tiekējas „Chemipol”, Ispanija. Aktyvūs komponentai (2.7–2.9):

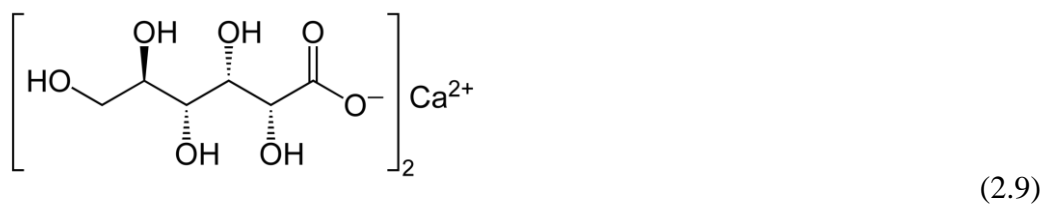
- Natrio benzoatas;



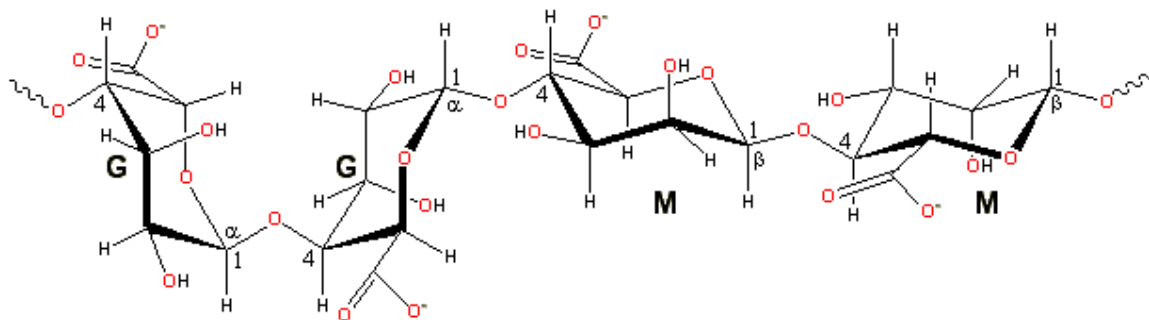
- Gliukonolaktonas;



- Kalcio gliukonatas;

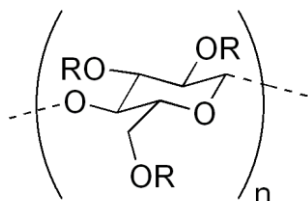


- Natrio alginatas (2.10) gautas iš Vilniaus įmonės UAB „Labochema LT“. Grynumas 99 %;



(2.10)

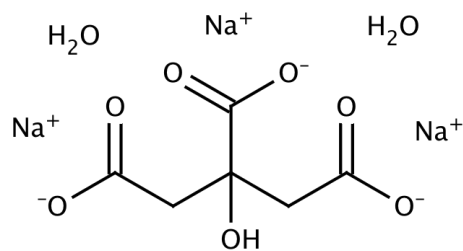
- Hidroksietilceliuliozė (2.11) gauta iš Sigma Aldrich, molekulinė masė (MM) apie 1300000;



R = H or CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

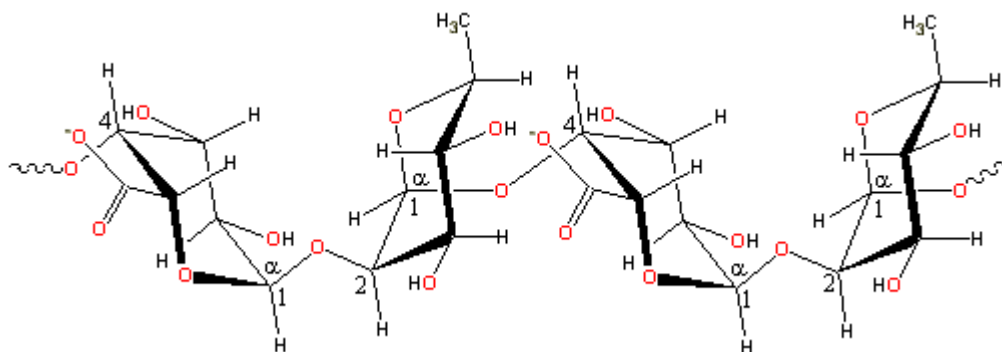
(2.11)

- Natrio citratas dihidratas (2.12), gautas iš UAB „Eurochemicals“ (Vilnius);



(2.12)

- Pektinas iš citrusinių vaisių žievės (2.13), grynumas ≥ 74 % sausos masės, gautas iš Sigma Aldrich.



(2.13)

Taip pat naudotos tokios chemiškai grynos medžiagos:

- natrio chloridas (UAB „Eurochemicals“, Vilnius);
- druskos rūgštis (UAB „Eurochemicals“, Vilnius);
- bevandenis kalcio chloridas (Merck, Vokietija);
- natrio šarmas (UAB „Eurochemicals“ Vilnius).

Tyrimams naudotos tokios mikroorganizmų mitybinės terpės:

- *MRS Broth with Tween 80*, REF 4017292, gamintojas „Biolife“, Italija;
- *MRS Agar with Tween 80*, REF 4017282, gamintojas „Biolife“, Italija.

Tyrimams naudota bakterijų kultūra:

Šiame darbe tyrimams naudojama *Lactobacillus plantarum* kultūra, išskirta KTU Maisto Institute.



## 2.2 Tyrimo metodai

### 2.2.1 Terpių ir tirpalų paruošimas

#### Sterilus distiliuotas vanduo

Tyrimams naudojamas distiliuotas vanduo, kuriame nėra medžiagų, slopinančių ar kitaip veikiančių mikroorganizmų augimą. Distiliuotas vanduo išpilstomas į mėgintuvėlius ir sterilizuojamas 15 min autoklave (*VaporMatic 770*, Italija)  $121 \pm 1$  °C temperatūroje 1,1 bar slėgyje.

#### Kalcio chlorido tirpalas

Tyrimams naudojamas 10 % koncentracijos kalcio chlorido tirpalas. Jis ruošiamas steriliuose laboratoriniuose induose naudojant sterilų distiliuotą vandenį.

#### Fiziologinis tirpalas

Tyrimams ruošiamas 0,85 % koncentracijos natrio chlorido tirpalas: 8,5 g NaCl ištirpinama 1000 ml distiliuoto vandens. Gautas tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 9,2 ml ir sterilizuojama 15 min *VaporMatic 770* autoklave  $121 \pm 1$  °C temperatūroje 1,1 bar slėgyje.

#### Natrio citrato dihidrato tirpalas

Tyrimams ruošiamas 4 % koncentracijos natrio citrato dihidrato tirpalas: 40 g natrio citrato dihidrato ištirpinama 1000 ml distiliuoto vandens. Gautas tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 9,2 ml ir sterilizuojama 15 min autoklave  $121 \pm 1$  °C temperatūroje 1,1 bar slėgyje.

#### Natrio alginato tirpalas

Tyrimams ruošiamas 2 % natrio alginato tirpalas: 2 g natrio alginato ištirpinama 100 ml sterilaus distiliuoto vandens. Kadangi alginatas ilgai brinksta vandenyje, jis maišomas naudojant magnetinę maišyklę (*IKA® RET basic safety control*, Vokietija) ir šildant 40 °C temperatūroje tol, kol susidaro vienalytis tirpalas. Gautas tirpalas veikiamas ultragarsu vonelėje (*Transsonic T460 ELMA*, Vokietija), kol jame nelieka oro burbuliukų. Alginato tirpalas sterilinamas švitinant 30 min UV spinduliais.

#### Pektino tirpalas

Tyrimams ruošiamas 2 % pektino tirpalas: 2 g pektino ištirpinama 100 ml sterilaus distiliuoto vandens. Kadangi pektinas ilgai brinksta vandenyje, jis maišomas naudojant magnetinę maišyklę (*IKA® RET basic safety control*, Vokietija) tol, kol susidaro vienalytis tirpalas. Gautas tirpalas veikiamas ultragarsu vonelėje (*Transsonic T460 ELMA*, Vokietija), kol jame nelieka oro burbuliukų. Pektino tirpalas sterilinamas švitinant 30 min UV spinduliais.

### Hidroksietilceliuliozės tirpalas

Tyrimams paruošiamas 1 % HEC tirpalas: 1 g HEC ištirpinama 100 ml sterilaus distiliuoto vandens. HEC ilgai brinksta vandenyje, todėl ji paliekama per naktį kambario temperatūroje, kad išbrinktų. HEC tirpinama maišant magnetine maišykle. Gautas tirpalas veikiamas ultragarsu vonelėje (*Transsonic T460 ELMA*, Vokietija), kol jame nelieka burbuliukų. HEC tirpalas sterilinamas švitinant 30 min UV spinduliais.

### Terpės

Mikrobiologiniams tyrimams naudojama *MRS Agar with Tween 80* mitybinė terpė buvo paruošta 70,2 g sausos terpės ištirpinant 1000 ml distiliuoto vandens ir autoklavuojant (*VaporMatic 770*, Italija) 15 min, esant  $121 \pm 1$  °C temperatūrai, 1,1 bar slėgiui. Skysta *MRS Broth with Tween 80* mitybinė terpė pagaminama 55,2 g sausos terpės ištirpinant 1000 ml distiliuoto vandens ir autoklavuojant (*VaporMatic 770*, Italija) 15 min, esant  $121 \pm 1$  °C temperatūrai, 1,1 bar slėgiui. Bakterijų augimo kreivių nustatymui skysta mitybinė terpė su skirtingomis pH reikšmėmis paruošiama reguliuojant pH reikšmę su 0,1 M druskos rūgštis arba 0,1 M natrio šarmo tirpalais. Paruošta terpė sterilinama autoklave (*VaporMatic 770*, Italija) 15 min, esant  $121 \pm 1$  °C temperatūrai, 1,1 bar slėgiui.

## **2.2.2 Bakterijų kultūros palaikymas ir auginimas skystoje mitybinėje terpėje**

Tyrimams naudotos bakterijos saugojamos ant nuožulnaus agaro terpės 5 °C temperatūroje. Bakterijų kultūros gyvybingumui išlaikyti, ji persėjama kas 1 mėnesį.

Prieš pradėdant įkapsuliuoti, paruošiama bakterijų suspensija. Užaugintos bakterijos nuo nuožulnaus agaro perkeliama į skystą mitybinę terpę (10 ml) ir inkubuojamos 24 val., esant 30 °C temperatūrai. Po inkubacijos į 100 ml sterilios skystos mitybinės terpės įpilama 1 ml kultūros, kuri buvo užauginta skystoje terpėje. Ši terpė su pasėta kultūra inkubuojama 20 val. iki stacionarios augimo fazės 30 °C temperatūroje. Užaugusi kultūra centrifuguojama (*Centrifuge MPW-260RH*, Lenkija) 6000 aps./min, 7 min 50 ml centrifuginiuose mėgintuvėliuose. Centrifuguotos bakterijų ląstelės du kartus praplaunamos steriliu vandeniu, kuris pašalinamas centrifuguojant. Perplautos ląstelės praskiedžiamos fiziologiniu tirpalu iki  $10^8$  KSV ml<sup>-1</sup>.

## **2.2.3 Bakterijų augimo kreivių nustatymas**

Užaugusios bakterijos nuo nuožulnaus agaro perkeliama į skystą mitybinę terpę ir inkubuojamos 24 val. 30 °C temperatūroje. Po inkubacijos 1 % kultūros suspensijos perkeliama į

skystą skirtingos pH (nuo 3 iki 9) mitybinę terpę. Terpė su pasėta bakterijų kultūra inkubuojama 30 °C temperatūroje. Augimo kreivės nustatomos matuojant bakterijų suspensijos optinį tankį 546 nm ilgio bangoje spektrofotometru *MRC UV-200-RS*. Matavimui naudojamos iš optinio polistireno pagamintos vienkartinės kiuvetės (spindulio kelias 10 mm), į kurias pilama po 2 ml mėginio. Matavimai atliekami kas 1 val., kol pasiekiami stacionari augimo fazė.

## 2.2.4 Kapsulių gavimas ir liofilizacija

Kapsulėms gauti buvo naudojamas ekstruzijos metodas. Pirmiausia paruošiami 2 % natrio alginato, 2 % pektino ir 1 % HEC polimerų tirpalai, kurie sumaišomi skirtingais santykiais, nurodytais 2.1 lentelėje. Taip pat paruošiamas 10 % kalcio chlorido tirpalas. Tada paruoštas polimerų tirpalų mišinys išspaudžiamas pro švirkšto adatą į kalcio chlorido druskos tirpalą, kuris maišomas naudojant magnetinę maišyklę. Gautos kapsulės du kartus praplaunamos steriliu vandeniu ir laikomos steriliame vandenyje 5 °C temperatūroje.

2.1 lentelė. Polimerų tirpalų santykiai mišinyje

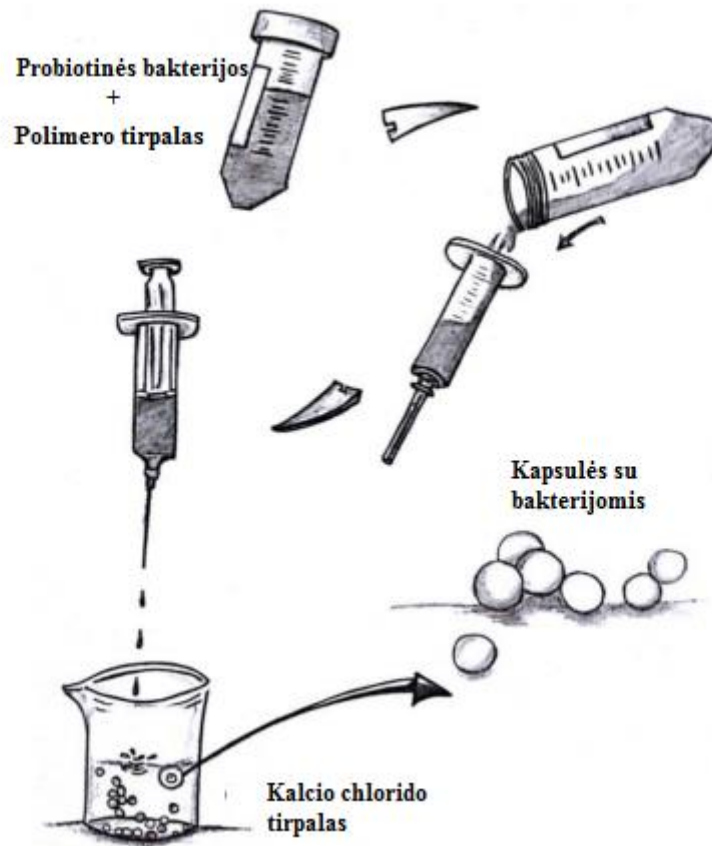
Bandinio numeris	Polimerų vandeninių tirpalų koncentracija	Santykiai mišinyje
1	Natrio alginatas (2 %)	-
2	Natrio alginatas (2 %) : Pektinas (2%) : HEC (1%)	1:1:1
3	Natrio alginatas (2 %) : Pektinas (2%) : HEC (1%)	2:1:1
4	Natrio alginatas (2 %) : Pektinas (2%) : HEC (1%)	1:1:2
5	Natrio alginatas (2 %) : HEC (1%)	1:1
6	Natrio alginatas (2 %) : HEC (1%)	1:2,3
7	Natrio alginatas (2 %) : HEC (1%)	2,3:1

Liofilizacija – tai džiovinimo metodas, kurio metu tirpiklis sublimuojasi, t.y. iš kietos fazės pereina į dujinę. Šio proceso metu iš užšaldyto mėginio esant vakuumui pašalinamas tirpiklis. Liofilizuojant pašalinama iki 97 % vandens.

Pagamintos makrokapsulės laikomos užšaldytos azote, po to liofilizuojamos. Liofilizacija vykdoma -110 °C temperatūroje *Christ ALPHA 2–4 LSC* liofilizatoriuje 24 val.

## 2.2.5 Bakterijų įkapsuliavimas

Probiotikų įkapsuliavimo ekstruzijos metodu schema pateikiama 2.1 paveiksle.

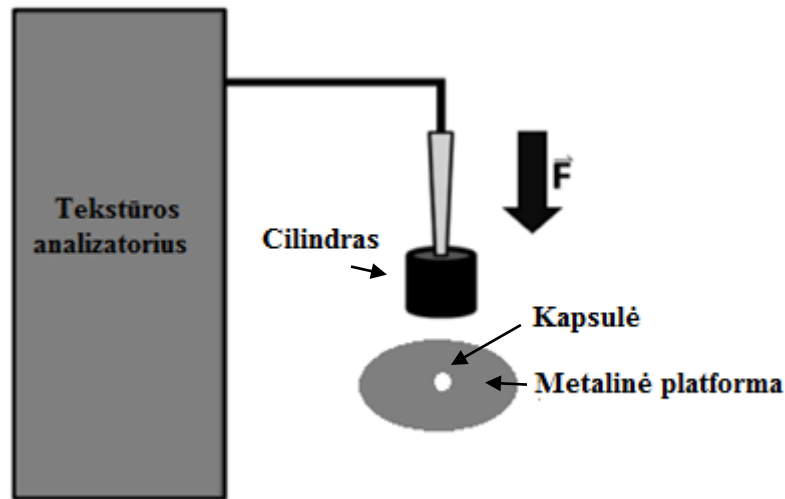


2.1 pav. Probiotikų įkapsuliavimas ekstruzijos metodu [41]

Probiotinės bakterijos įkapsuliuojamos pagal metodiką, nurodytą 2.2.4 skyrelyje.  $10^8$  KSV ml<sup>-1</sup> probiotinių bakterijų suspensija įpilama į polimerų tirpalų mišinį prieš kapsulių išsėsdinimą kalcio chlorido druskos tirpale.

## 2.2.6 Kapsulių mechaninių savybių nustatymas

Makrokapsulių mechaninės savybės nustatomos naudojant tekstūros analizatorių *TA.XT plus* (Stable Micro System, UK) su jėgos cele, platforma ir bazine kompiuterine programa. Prietaiso schema pateikiama 2.2 paveiksle.



**2.2 pav.** Tekstūros analizatoriaus schema

Tyrimo metu kapsulė, išdžiovinta ant filtrinio popieriaus, dedama ant metalinės platformos, centruojant su 20 mm skersmens aliuminiu cilindru (jėgos cele). Tada cilindras stumiamas žemyn 1 mm/s greičiu, kol ant kapsulės paviršiaus aptinkama 5 g jėga. Kai aptinkama jėga, cilindras 1,0 mm/s greičiu įsminga į kapsulę 1 mm. Po to cilindras grįžta į pradinę padėtį 10 mm/s greičiu. Maksimali spaudimo jėga yra fiksuojama kaip kietumas. Analizės metu buvo matuojama po 10 kiekvienos rūšies kapsulių.

### **2.2.7 Makrokapsulių dydžio nustatymas**

Neliofilizuotų ir liofilizuotų makrokapsulių dydis nustatomas matuojant mikroskopu *MPB-2*, objektyvu su skale (paklaida  $\pm 0,05$  mm), didinančiu 24 kartus. Tiek liofilizuotos, tiek neliofilizuotos makrokapsulės buvo brkinamos vandenyje, mineraliniame aliejuje, 4 % cetearilo alkoholio tirpale mineraliniame aliejuje, 5 % glicerolio stearato tirpale mineraliniame aliejuje, 3,5 % cetareth 20 tirpale mineraliniame aliejuje, glicerolyje 24 val. ir 1 mėnesį ir išmatuojamas jų dydis. Analizės metu buvo matuojama po 10 kiekvienos rūšies kapsulių. Taip pat įvertinamas standartinis nuokrypis.

### **2.2.8 Skenuojančioji elektroninė mikroskopija ir mikroskopiniai tyrimai**

Makrokapsulių morfologija stebima naudojant aukštos skiriamosios gebos skenuojantį elektroninį mikroskopą *FEI Quanta 200 FEG* (Olandija) su Šotki tipo elektronų patranka. Mėginiai pritvirtinami dvipusės limpančios medžiagos pagalba. Liofilizuotos įkapsuliuotos bakterijos stebimos, padidinus 100, 1000 ir 5000 kartų. Mikroskopinio stebėjimo metu daromos preparatų nuotraukos. Tyrimas atliktas „Santakos“ slėnyje.

Neliofilizuotos įkapsuliuotos bakterijos stebimos suspaustame laše. Pirmiausia makrokapsulės nudažomos metileno mėlynojo dažais. Po to steriliu skalpeliu daromas makrokapsulės pjūvis. Dalis makrokapsulės uždedama ant švaraus objekcinio stiklelio paviršiaus, paskirstoma maždaug 1 cm<sup>2</sup> plote ir užlašinama distiliuoto vandens. Tada stiklelis uždengiamas dengiamuoju stikleliu taip, kad nesusidarytų oro burbulų, todėl dengiamasis stiklelis dedamas ne ant viršaus, bet statomas prie lašo krašto ir pamažu nuleidžiamas. Tokiu būdu išstumiamas oras, esantis tarp dengiamojo ir objekcinio stiklelio. Taip paruoštas preparatas analizuojamas epifluorescenciniu mikroskopu *Eclipse Ni-u* naudojant imersinį aliejų ir stebint per 100 kartų didinantį objektyvą. Stebėjimo metu daromos preparatų nuotraukos.

### 2.2.9 Gyvybingų *Lactobacillus plantarum* bakterijų skaičiaus nustatymas

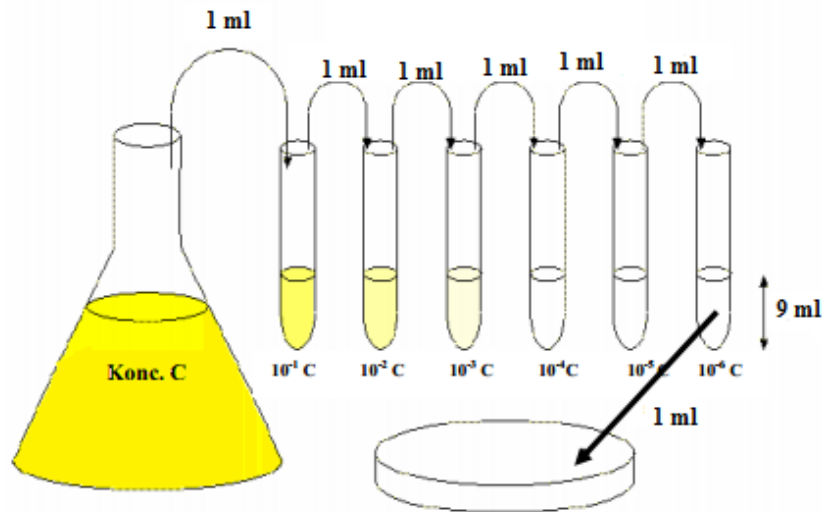
Mikroorganizmų skaičius tiriamojame medžiagoje turi būti nustatomas kaip galima tiksliau, todėl visi tyrimams naudojami įrenginiai, medžiagos ir reagentai turi atitikti galiojančius normatyvinius dokumentus. Mikrobiologiniams tyrimams skirti indai sterilizuojami. Mėgintuvėliai ir kiti indai, taip pat naudojama agarų terpė, yra sterilizuojami vandens garais autoklave ne mažiau kaip 15 min ir ne žemesnėje kaip 121±1 °C temperatūroje 1,1 baro slėgyje.

**Kosmetinių medžiagų poveikis įkapsuliuotoms bakterijoms.** Mėginiai imami steriliomis sąlygomis, steriliomis priemonėmis (naudojamos vienkartinės pipetės). Atliekant tyrimus su įkapsuliuotomis bakterijomis, buvo daromi skiediniai (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>). Pagamintos kapsulės (6 g) sumaišomos su reikiamos koncentracijos tiriamųjų medžiagų tirpalais (20 ml). Po tam tikro laiko imamas 1 g šių kapsulių ir kelis kartus praplaunama steriliu vandeniu. Tada kapsulės sumaišomos su 9 ml natrio citrato dihidrato tirpalu. Gautas mišinys purtomas orbitine purtykle *Vortex* 1400 aps. min<sup>-1</sup> tol, kol makrokapsulės suyra. Taip paruošiamas pirmas skiedinys (10<sup>1</sup>). Toliau 1 ml pirmojo skiedinio perkeliama į mėgintuvėlį su 9 ml skiedinio ir gaunamas antrasis skiedinys (10<sup>2</sup>). Analogiškai daromi ir kiti skiediniai (žr. 2.3 pav.). Pasirinkti dešimtkartiniai skiediniai užsėjami mitybinėje terpėje Petri lėkštelėse giluminiu būdu. Kiekvienam pasirinktam skiediniui imama po dvi Petri lėkšteles. Į šias lėkšteles sterilia pipete įpilama po 1 ml mėginio. Į kiekvieną Petri lėkštelę įpilama po 12-15 ml sterilios mitybos terpės, atvėsintos iki 45 °C temperatūros. Pasėtas mėginys maišomas su terpe, sukant Petri lėkšteles. Leidžiama mišiniui sustingti, paliekant Petri lėkšteles ant šalto horizontalaus paviršiaus. Lėkštelės apverčiamos ir inkubuojamos 24 val. 30 °C temperatūroje. Sėjimai atliekami po 0; 0,5; 24; 48 ir 96 val.

Tiriant įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumą makrokapsulėse jų laikymo metu, sėjimai buvo atlikti kas savaitę. Iš viso buvo matuojama keturias savaites.

**Kosmetinių medžiagų poveikis neįkapsuliuotai kultūrai.** Mėginiai imami steriliomis sąlygomis, steriliomis priemonėmis (naudojamos vienkartinės pipetės). Atliekant tyrimus su neįkapsuliuota kultūra, buvo daromi skiediniai ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ). 1 ml grynos kultūros sumaišoma su 20 ml reikiamos koncentracijos tiriamųjų medžiagų tirpalais. Tada imamas 1 ml mišinio sumaišoma su 9 ml atitinkamo skiediklio, taip paruošiamas pirmas skiedinys ( $10^1$ ). Kiti skiediniai ir sėjimai daromi analogiškai kaip ir nustatant gyvybingų mikroorganizmų skaičių makrokapsulėse. Kontroliniai mėginiai paruošiami analogiškai, tik įdedama į sterilų distiliuotą vandenį.

**Gyvybingų mikroorganizmų skaičiaus nustatymas kontroliniame bandinyje.** Matavimams paruošiamas kontrolinis mėginys, kuris gaunamas makrokapsulės sumaišius su steriliu vandeniu. Skiediniai ir sėjimai daromi analogiškai kaip ir nustatant gyvybingų mikroorganizmų skaičių makrokapsulėse.



**2.3 pav.** Serijinio skiedimo technika

Lėkštelėje išaugusios mikroorganizmų kolonijos suskaičiuojamos. Bakterinis užterštumas išreiškiamas kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičiumi 1 g (ml) produkto. Rezultatai suapvalinami iki dviejų reikšminių skaičių. Terminas „kolonijas sudarantys vienetai“ vartojamas todėl, kad mitybos terpėje matomos kolonijos gali išaugti tiek iš vienos ląstelės, tiek ir iš didesnio kiekio sulipusių ląstelių, todėl negalima teigti, kad kolonijų skaičius visiškai atitinka bakterijų skaičių.

KSV skaičius 1 g (ml) produkto nustatomas iš 2.14 formulės:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} \quad (2.14)$$

čia:  $\sum C$  – suma kolonijų, suskaičiuotų ant visų vertinimui atrinktų lėkštelių;

$n_1$  – skaičius pirmojo skiedinio lėkštelių, kuriose buvo suskaičiuotos kolonijos;

$n_2$  – skaičius antrojo skiedinio lėkštelių, kuriose buvo suskaičiuotos kolonijos;

$d$  – skiedinio koeficientas, atitinkantis pirmąjį skiedinį.

### 2.2.10 Bakterijų atsipalaidavimas ant odos paviršiaus, tepant kremą

Bakterijų atsipalaidavimas ant odos paviršiaus, tepant kremą, įvertinamas nuoplovų metodu. Metodas pagrįstas kremu išteptų rankų nuvalymu sudrėkintu skiediklyje steriliu vatos tamponu, jo nuskalavimu skiediklyje ir sėjimu į mitybos terpę. Nuoplovoms tirti buvo naudojami vienkartiniai tamponai iš vatos. Juos darant, 20–30 cm ilgio tiesi tvirta viela perkišama per vatos kamštį, ant galo užvyniojamas vatos tamponas ir įkišamas į mėgintuvėlį, kuriame yra 4 ml skiediklio. Tamponas neturi liesti skysčio ir iki naudojimo turi likti sausas. Viskas sterilizuojama autoklave (*VaporMatic 770*, Italija) 15 min esant  $121 \pm 1$  °C temperatūrai, 1,1 bar slėgiui. Tuomet, norint įvertinti bakterijų atsipalaidavimą, tamponas sudrėkinamas skiediklyje ir juo nutrinama kremu išteptų sterilių pirštinių apatinė ir viršutinė dalis, pirštai, tarpupirščiai. Po to tamponas įkišamas atgal į mėgintuvėlį, paneriamas į skiediklį ir nuskalaujamas jame. Tada imamas 1 ml nuoplovų ir sumaišoma su 9 ml atitinkamo skiediklio, taip paruošiamas pirmas skiedinys ( $10^1$ ). Kiti skiediniai ir sėjimai daromi analogiškai kaip ir nustatant gyvybingų mikroorganizmų skaičių makrokapsulėse.

Atsipalaidavimas % apskaičiuojamas naudojant 2.15 formulę:

$$A = \left( \frac{\text{Log}_{10} X}{\text{Log}_{10} N_0} \right) \times 100 \quad (2.15)$$

$X$  – atpalaiduotų bakterijų skaičius;

$N_0$  – bakterijų skaičius po įkapsuliavimo (kapsulės vandenyje).



### 2.2.11 Rankų kremo A/V gavimas

Mikroorganizmų gyvybingumui nustatyti kosmetikos preparate, buvo pagamintas kremas pagal 2.2 lentelėje pateiktą receptūrą.

2.2 lentelė. Kremo receptūra

Pavadinimas	INCI	Masė, %
Mineralinis aliejus	Mineral Oil	6,0
Cetearilo alkoholis	Cetearyl Alcohol	4,0
Glicerolio stearatas	Glyceryl Stearate	5,0
Emulginas B <sub>2</sub>	Cetareth 20	3,5
Konservantas Sensicare M 4200	Preservative	p.p.
Glicerolis	Glycerol	2,0
Vanduo	Aqua	iki 100

#### Darbo eiga:

- Sumaišomi aliejinės fazės komponentai ir pašildomi iki 80–85 °C.
- Sumaišomi vandeninės fazės komponentai ir pašildomi iki 80–85 °C.
- Sumaišomos abi fazės, supilant aliejinę fazę į vandeninę, energingai maišant.
- Lėtai maišant atšaldoma iki 30–35 °C.
- Įpilamas konservantas.

### 2.2.12 Pienelio A/V gavimas

Siekiant įvertinti mikroorganizmų gyvybingumą kosmetikos preparate, buvo pagamintas pienelis pagal 2.3 lentelėje nurodytą receptūrą.

2.3 lentelė. Pienelio receptūra

Pavadinimas	INCI	Masė, %
Mineralinis aliejus	Mineral Oil	5,0
Cetearilo alkoholis	Cetearyl Alcohol	3,0
Glicerolio stearatas	Glyceryl Stearate	1,0
Emulginas B <sub>2</sub>	Cetareth 20	0,5
Konservantas Sensicare M 4200	Preservative	p.p.
Glicerolis	Glycerol	10,0
Vanduo	Aqua	iki 100

**Darbo eiga:**

- Sumaišomi aliejinės fazės komponentai ir pašildomi iki 80–85 °C.
- Sumaišomi vandeninės fazės komponentai ir pašildomi iki 80–85 °C.
- Sumaišomos abi fazės, supilant aliejinę fazę į vandeninę, energingai maišant.
- Lėtai maišant atšaldoma iki 30–35 °C.
- Įpilamas konservantas.

**2.2.13 Standartinio nuokrypio skaičiavimas**

Šiame darbe tyrimo rezultatai pateikiami mažiausiai kaip trijų bandymų aritmetinė reikšmė. Apskaičiuotiems vidurkiams įvertinami standartiniai nuokrypiai (*SN*). Tarkime, kad išmatavus *n* kartų fizikinį dydį *x*, gavome tokias reikšmes:  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ . Tikrosios matuojamojo dydžio vertės, t.y. galutinio matavimo rezultato, įverčiu laikoma matavimo rezultatų vidutinė (aritmetinė) reikšmė. Aritmetinis vidurkis apskaičiuojamas pagal (2.16) formulę.

$$\bar{x}_n = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.16)$$

*n* – matavimų skaičius,  $x_i$  – *i*-tojo matavimo metu gauta matuojamojo dydžio vertė.

Taip pat įverinimas ir standartinis nuokrypis arba vidutinė kvadratinė paklaida.

Matavimo rezultato *x* standartinis nuokrypis apskaičiuojamas pagal (2.17) formulę.

$$SN = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.17)$$

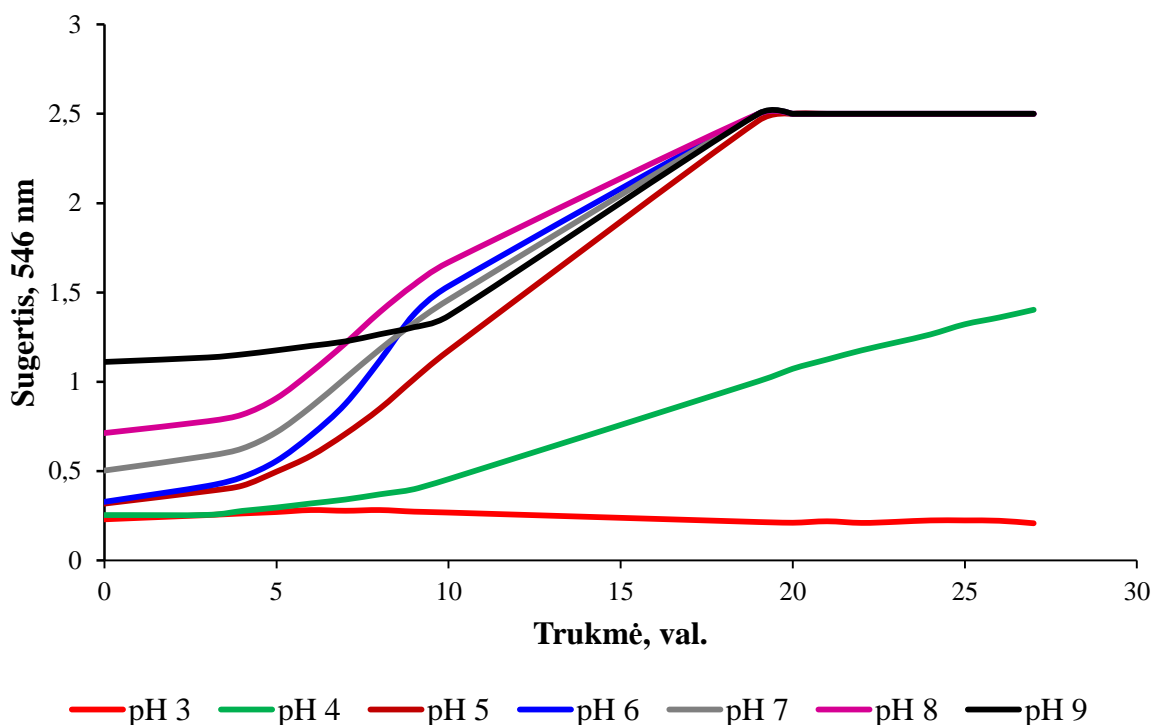
*n* – matavimų skaičius,  $x_i$  – *i*-tojo matavimo metu gauta matuojamojo dydžio vertė,  $\bar{x}$  – matavimo rezultatų aritmetinis vidurkis.

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 *Lactobacillus plantarum* augimo sąlygų tyrimai

Tyrimams buvo pasirinkta probiotinių *Lactobacillus plantarum* bakterijų kultūra – tai gramteigiamos, fakultatyviai anaerobinės bakterijos. Jos pasirinktos dėl gebėjimo atkurti atsparesnę odos mikroflorą po kiekvieno patogenų sunaikinimo. Be to, jų augimo temperatūra artima kūno temperatūrai. Ši kultūra gerina vandens hidrataciją odoje, gydo atopinį dermatitą ir pasižymi odos senėjimą stabdančiu poveikiu [60–62].

Siekiant išsiaiškinti optimalias probiotinių *L. Plantarum* augimo ir dauginimosi sąlygas, buvo nustatytos bakterijų augimo kreivės.



**3.1 pav.** *L. plantarum* augimo kreivės skirtinguose terpės pH

Augimo kreivės nustatomos matuojant bakterijų suspensijos 546 nm ilgio bangų absorbciją. Iš *L. plantarum* augimo kreivių, gautų terpėse su skirtingomis pH reikšmėmis, matyti, kad šios bakterijos neauga terpėje, esant pH 3. Ilgiausia lag fazė (9 val.) stebima, esant pH 4 ir 9, tuo tarpu terpėse, kurių pH reikšmės 7 ir 8, šios fazės trukmė tik 4 val. Terpėse su pH 5 ir 6 eksponentinio bakterijų augimo stadija prasideda panašiu metu – apytiksliai po 5 val., vadinasi, jų prisitaikymo fazė truko panašiai kaip terpėse, kurių pH reikšmės 7 ir 8. Iš gautų augimo kreivių taip pat matyti,

kad visose terpėse, išskyrus, esant pH 3 ir 4, stacionari augimo fazė prasidėjo tuo pačiu laiku – po 19 val.

Apžvelgus gautus rezultatus, matyti, kad *L. plantarum* geriausia auginti terpėse, esant pH tarp 5–8.

### 3.2 Kapsulių gavimas

Probiotikų įkapsuliavimui dažniausiai naudojamas alginatas, tačiau iš jo pagamintos kapsulės pasižymi ypatingu kietumu ir stangrumu. Kosmetikoje tokios kietos dalelės naudojamos tik produktuose, skirtose odos raginio sluoksnio pašalinimui (skutikliuose), tuo tarpu minkštos konsistencijos produktuose – kremuose, pieneliuose – kietos dalelės nėra pageidaujamos. Be to, iš kietų kapsulių yra apsunkintas bakterijų atsipalaidavimas ant odos. Todėl labai svarbu pagaminti kapsules, kurios nesugadintų produkto tekstūros, išlaikytų aukštą probiotikų gyvybingumą ir lengvai pasišalintų iš kapsulių kosmetikos produkto naudojimo metu.

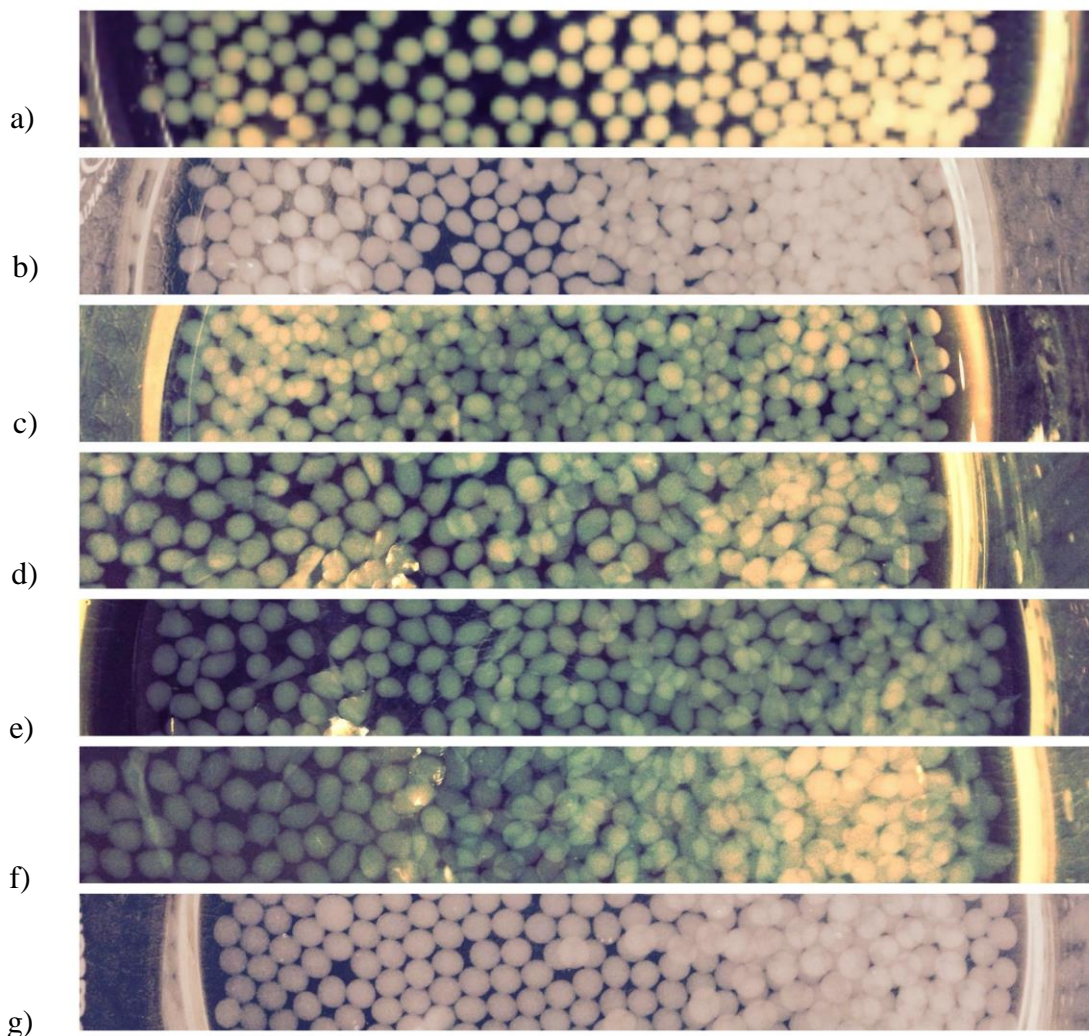
Siekiant pagaminti minkštesnes kapsules, buvo pasirinktas polimerų mišinys, susidedantis iš natrio alginato, pektino ir hidroksietilceliuliozės (HEC). Kapsulės pagamintos, maišant polimerų tirpalus skirtingais santykiais (žr. sk. 2.2.4). Gautų kapsulių sudėtis pateikta 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Polimerų masių santykiai kapsulėse

Bandinio numeris	Polimerai	Masės santykiai mišinyje
1	Natrio alginatas	1
2	Natrio alginatas:pektinas:HEC	1: 1: 1
3	Natrio alginatas:pektinas:HEC	2: 1: 1
4	Natrio alginatas:pektinas:HEC	1: 1: 2
5	Natrio alginatas:HEC	1: 1
6	Natrio alginatas:HEC	1: 2,3
7	Natrio alginatas:HEC	2,3: 1

Kapsulės gamintos ekstruzijos būdu, kadangi tai nebrangus metodas, nekenksmingas ląstelėms, užtikrina aukštą ląstelių gyvybingumą, tinka dirbui su nedideliais kiekiais.

Visų ekstruzijos metodu pagamintų kapsulių nuotraukos pateikiamos 3.2 paveiksle. Iš nuotraukų matyti, kad kapsulių (žr. a, c, g), kurių sudėtyje alginatas sudaro pusę polimerų masės ar daugiau, forma yra taisyklinga, apvali, o kapsulių (žr. b, d, e, f), kurių sudėtyje alginato yra mažiau nei pusė, pasitaiko nemažai ovalo formos dalelių. Taigi, kapsulių forma priklauso nuo polimerų mišinio sudėties.

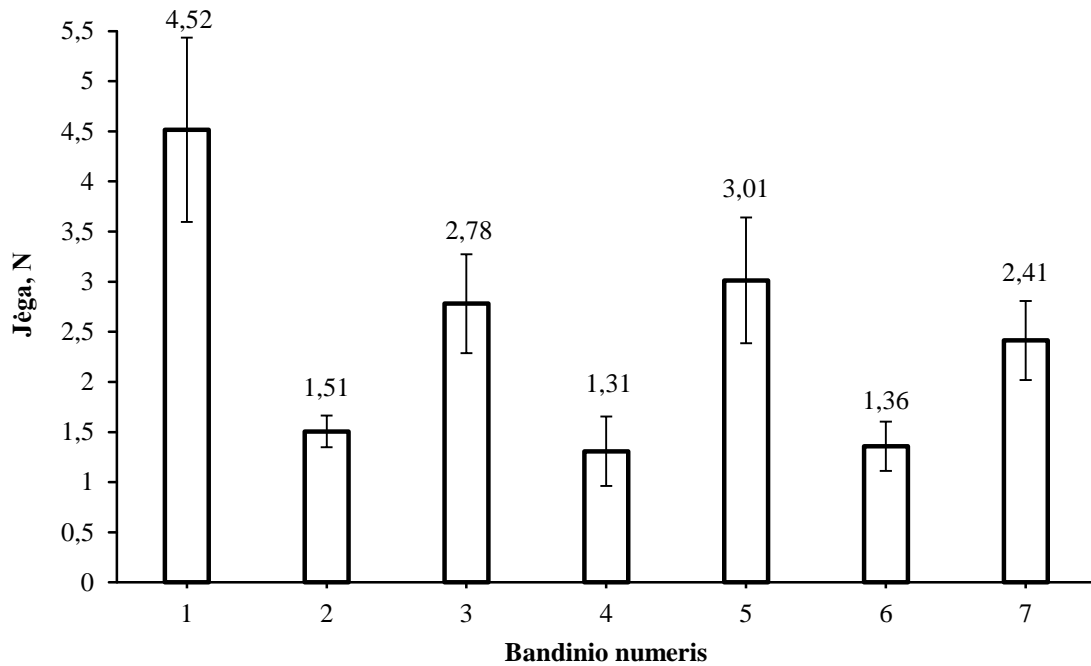


**3.2 pav.** Makrokapsulės: a) alginato; b) alginato:pektino:HEC (1:1:1); c) alginato:pektino:HEC (2:1:1); d) alginato:pektino:HEC (1:1:2); e) alginato:HEC (1:1); f) alginato:HEC (1:2,3); g) alginato:HEC (2,3:1)

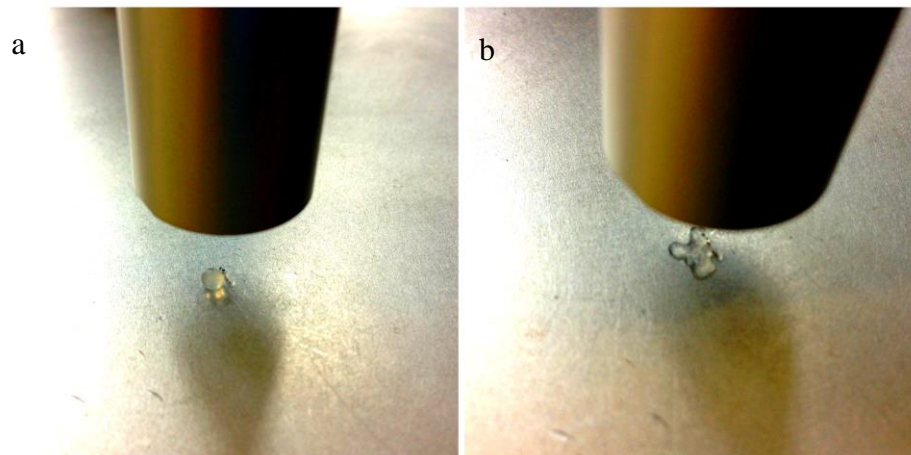
### 3.3 Makrokapsulių mechaninės savybės

Makrokapsulių kietumas yra svarbi charakteristika, turinti įtakos kosmetikos produkto tekstūrai ir bakterijų difuzijai iš kapsulių. Iš gautų duomenų pastebėta, kad stipriausios yra alginato kapsulės (1 bandinys), kurios atlaikė net 4,52 N mechaninę jėgą. Vidutiniu kietumu pasižymėjo 3, 5 ir 7 bandiniai, kurie atitinkamai atlaikė 2,78 N, 3,01 N ir 2,41 N jėgą. Mažiausiu kietumu pasižymėjo kapsulės, kurių sudėtyje yra daugiau HEC, t.y. 4 ir 6 bandiniai, – jie atlaikė tik 1,31 N ir 1,36 N jėgą. 2 bandinys atlaikė 1,51 N mechaninę jėgą, kuri yra kiek didesnė nei 4 ir 6 bandinių.

Apžvelgus gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad kapsulių mechaninės savybės priklauso nuo jų sudėties ir biopolimerų koncentracijos. Visais atvejais, didinant HEC kiekį polimerų sudėtyje, gaunamos minkštesnės kapsulės.



**3.3 pav.** Makrokapsulių kietumas: 1-alginato; 2-alginato:pektino:HEC (1:1:1); 3-alginato:pektino:HEC (2:1:1); 4-alginato:pektino:HEC (1:1:2); 5-alginato:HEC (1:1); 6-alginato:HEC (1:2,3); 7-alginato:HEC (2,3:1)

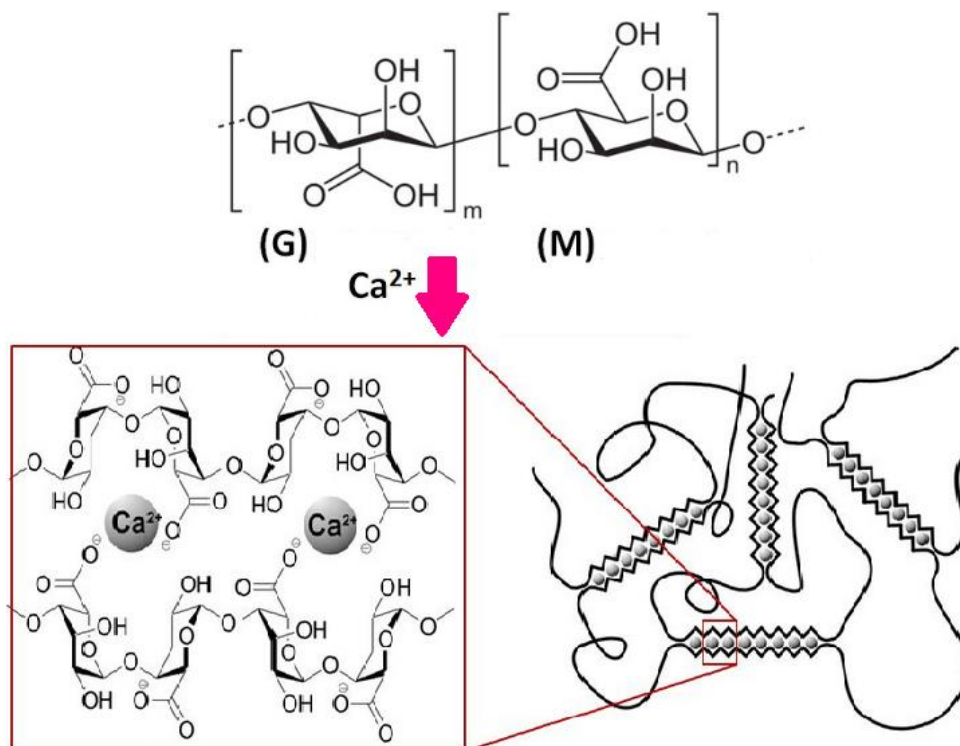


**3.4 pav.** Alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulių vaizdas a) prieš ir b) po kietumo nustatymo

3.4 paveiksle pateikiama 6 bandinio nuotrauka prieš ir po kietumo nustatymo. Analizės metu kapsulės yra suardomos.

### 3.4 Polimerų sąveika kapsulių formavimo metu

Kapsulės buvo gaminamos polimerų tirpalą lašinant į kalcio chlorido tirpalą. Šiuo metodu alginato kapsulės susidaro dėl natrio, esančio prie  $\alpha$ -L-gulurono (G) rūgšties karboksigrupės, jonų mainų su divalentišiais  $\text{Ca}^{2+}$  katijonais (žr. 3.5 pav.). Gaunamas trimatis tinklas, kuriame  $\text{Ca}^{2+}$  katijonai apsupami polimerinio alginato grandinėmis. Būtent ši „kiaušinio–dėžutės“ struktūra leidžia įterpti gyvas ląsteles į vidų, nesumažinant jų gyvybingumo [34, 39]. Analogiškai ir pektinas, sąveikaujant su kalcio jonais, sudaro tinklinę struktūrą.



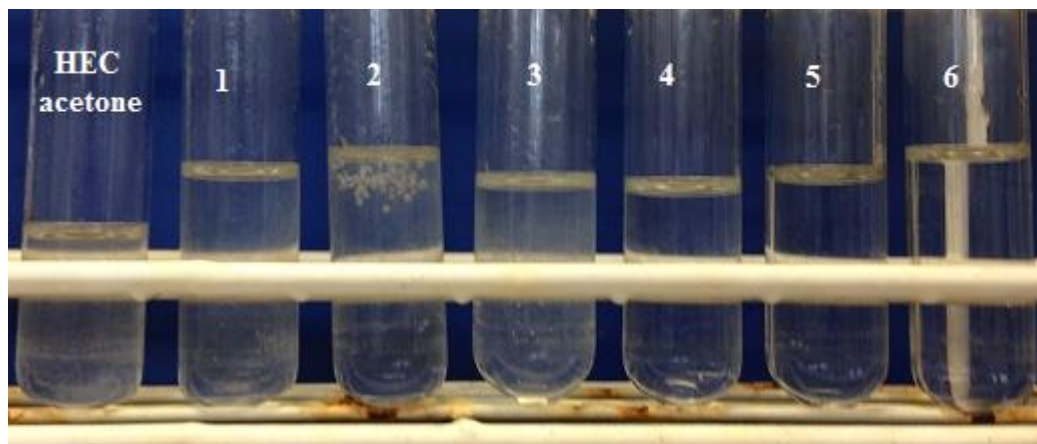
3.5 pav. „Kiaušinio–dėžutės“ struktūros susidarymo schema [63]

Tuo tarpu kapsulių su HEC susidarymo mechanizmas nėra aiškus, nes literatūroje informacijos apie tai nerasta. Kadangi HEC yra vandenyje tirpus, tai buvo įdomu nustatyti, ar šis polimeras nepasišalina kapsulių susidarymo metu ir laikant kapsules vandenyje.

Nustatyta, kad HEC netirpsta kalcio chlorido tirpale, naudojamo kapsulėms formuoti, todėl visas formuojamajame tirpale buvęs HEC išlieka kapsulėse.

Siekiant įsitikinti, ar HEC nepasišalina iš kapsulių laikant jas vandenyje, buvo atliekamas tyrimas acetone (žr. 3.6 pav.). Acetone HEC netirpsta ir iškrenta nuosėdomis. Tyrimas atliktas taip: į vieną mėgintuvėlį įpiltas HEC tirpalas acetone, kaip etalonas, o į likusius – vanduo, kuriame buvo laikytos skirtingos kapsulės. Įpylus vienodą kiekį acetono į visus mėgintuvėlius su vandeniu,

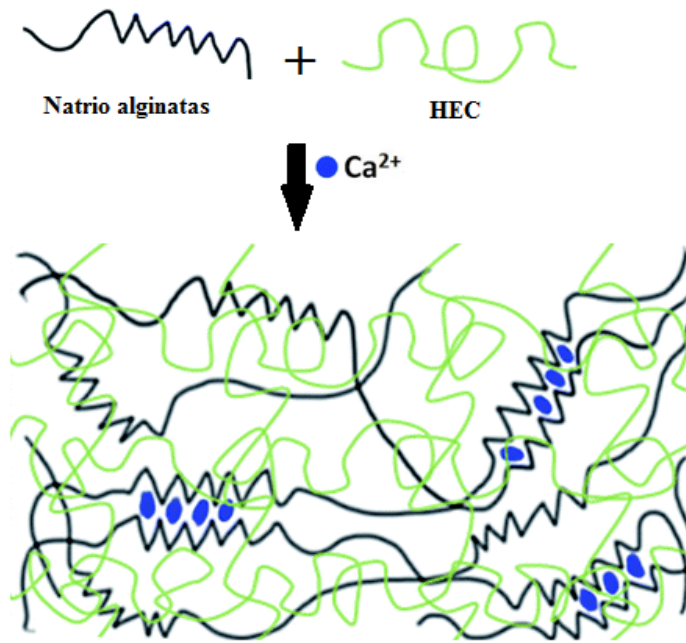
pastebėta, kad 1, 2 ir 3 numeriu pažymėtuose mėgintuvėliuose tirpalai tuoj pat susidrumstė, o 4, 5 ir 6 numeriu pažymėtuose mėgintuvėliuose tirpalai išliko skaidrūs. Taigi, palyginus su etaloniniu tirpalu, galima teigti, kad HEC atsipalaiduoja iš bandinių, kurių numeriai 1, 2 ir 3, t.y. tų kapsulių, kurių sudėtyje yra pektinas. Iš kapsulių be pektino HEC nepasišalina.



**3.6 pav.** HEC atsipalaidavimas iš kapsulių: 1-alginato:pektino:HEC (1:1:1); 2-alginato:pektino:HEC (2:1:1); 3-alginato:pektino:HEC (1:1:2); 4-alginato:HEC (1:1); 5-alginato:HEC (1:2,3); 6-alginato:HEC (2,3:1)

Tokiu atveju, kilo klausimas, kokių principu HEC užsilaiko kapsulėse. Tam, visų pirma, buvo atlikti polimerų biosuderinamumo tyrimai, išliejant dviejų polimerų mišinio tirpalus Petri lėkštelėse ir išdžiovinant gautas plėveles. Tyrimo metu buvo tikrinamas pektino-alginato, alginato-HEC ir HEC-pektino biosuderinamumas. Nustatyta, kad pektinas tiek su alginatu, tiek su HEC nesiderina, nes plėvelė nebuvo tolygi. Tuo tarpu alginato-HEC plėvelėje jokių polimerų atsiskyrimo požymių nepastebėta, t.y. alginatas pasižymi suderinamumu su HEC. Esant polimerų suderinamumui, galima tikėtis, HEC makromolekulės persipina su alginato makromolekulėmis ir sąveikauja vandenilniais ryšiais. Dėl šios sąveikos, įvykus alginato jonotropinei gelizacijai, HEC išlieka kapsulių sudėtyje (žr. 3.7 pav.). Literatūroje [64] taip pat daroma prielaida, kad alginato likusios laisvos karboksigrupės jungiasi su HEC hidroksigrupėmis.



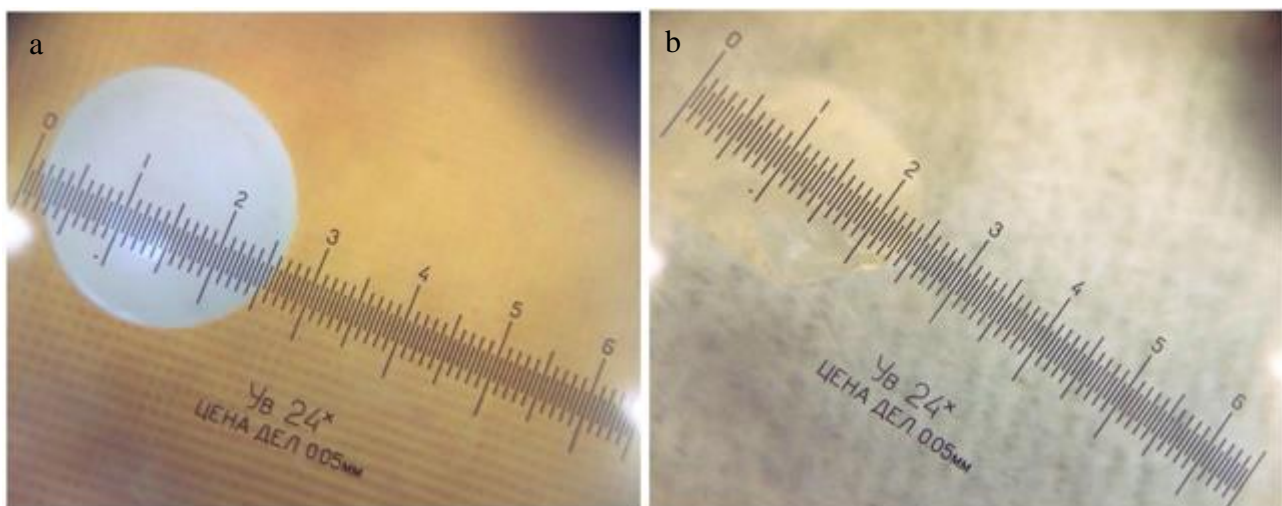


**3.7 pav.** Kalcio alginato-HEC struktūros susidarymo schema

Remiantis gautais duomenimis kapsulių, kurių sudėtyje yra pektino, atsisakyta ir tolimesni tyrimai atliekami su alginato ir alginato-HEC kapsulėmis. Be to, dalis kapsulių buvo liofilizuota, kadangi kai kuriais atvejais (transportavimo, saugojimo) kapsulės pageidaujamos sausame pavidale.

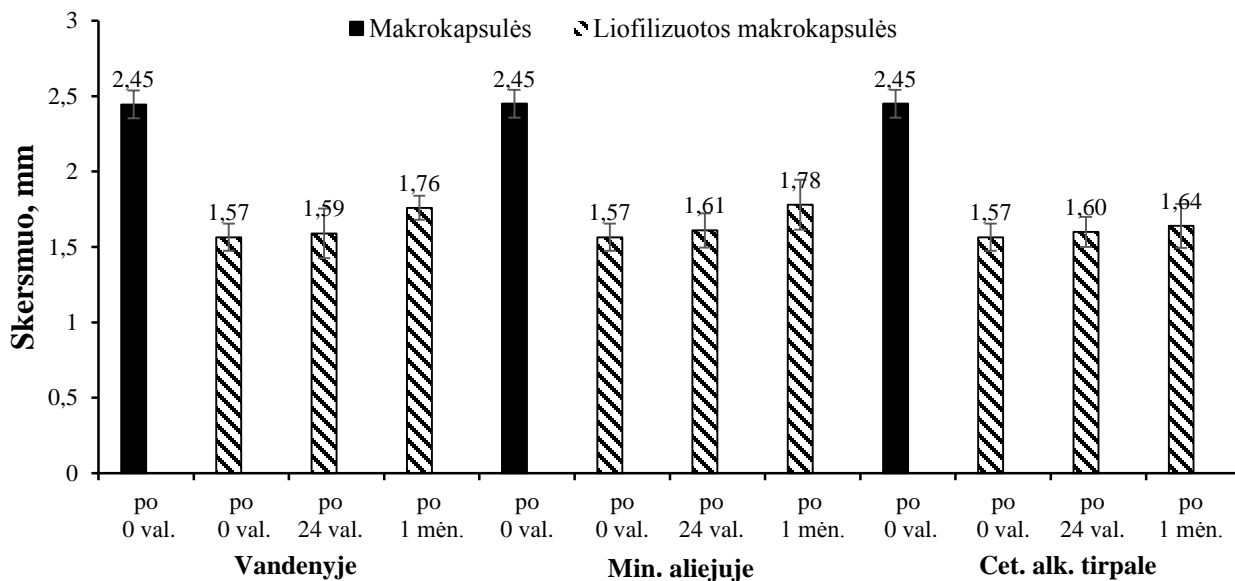
### 3.5 Makrokapsulių dydžio nustatymas

Neliofilizuotų (žr. 3.8a pav.) ir liofilizuotų (žr. 3.8b pav.) makrokapsulių dydis nustatytas matuojant mikroskopu.

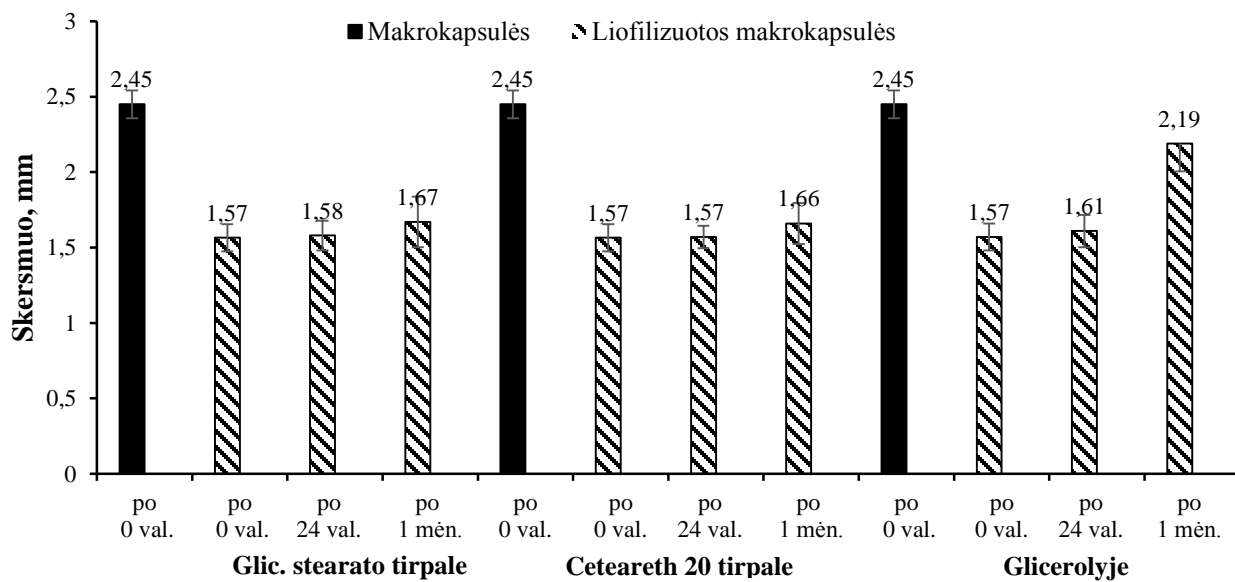


**3.8 pav.** Neliofilizuotų (a) ir liofilizuotų (b) makrokapsulių mikroskopinės nuotraukos

Liofilizuotų ir neliofilizuotų makrokapsulių dydis išmatuotas ir po jų brinkinimo tam tikrą laiko tarpą (24 val. ir 1 mėn.) terpėse bei tirpaluose su medžiagomis, kurias numatoma naudoti kosmetikos produktuose: vandenyje, mineraliniame aliejuje, glicerolyje bei tirpaluose su cetearilo alkoholiu, glicerolio stearatu ir cetareth 20 (žr. 3.9–3.14 pav.). Visų rūšių neliofilizuotų makrokapsulių dydis po jų brinkinimo 24 val. ir 1 mėn. tiriamuosiuose tirpaluose buvo toks pats kaip po 0 val., todėl grafikuose rodomas tik vienas laiko momentas.

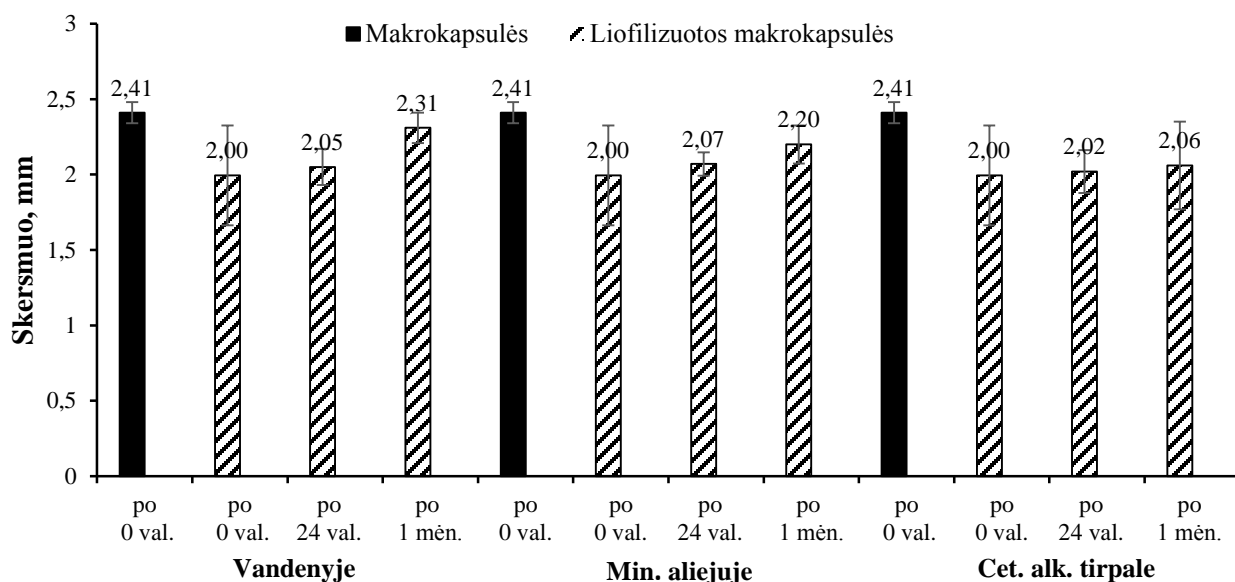


3.9 pav. Alginato makrokapsulių dydis, mm

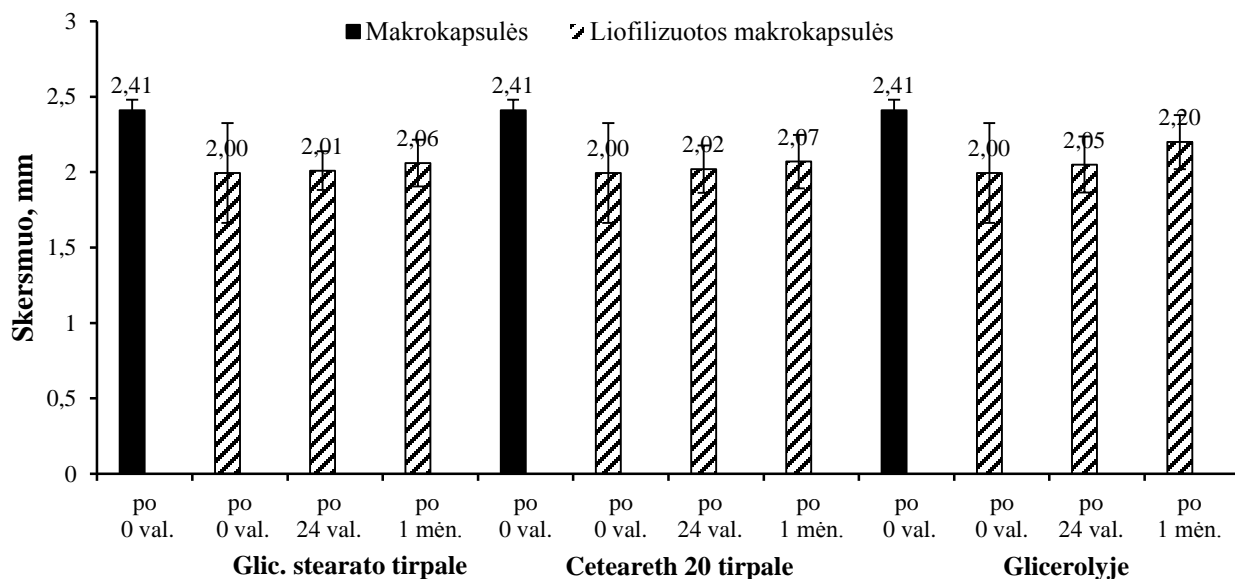


3.10 pav. Alginato makrokapsulių dydis, mm

Alginato makrokapsulių dydis pateiktas 3.9 ir 3.10 paveiksluose. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad po liofilizacijos makrokapsulių dydis sumažėjo 36 %. Nors liofilizuotos makrokapsulės buvo brinkinamos vandenyje, mineraliniame aliejuje, tirpaluose su cetareth 20, cetearilo alkoholiu, glicerolio stearatu 24 val. ir 1 mėn., pastebėta, kad makrokapsulės praktiškai nebrinksta nei viename iš komponentų, kadangi jų dydžio pokytis yra minimalus. Žymesnis liofilizuotų kapsulių dydžio pokytis pastebėtas po 1 mėnesio brinkinimo glicerolyje – dydis padidėjo 36 %.

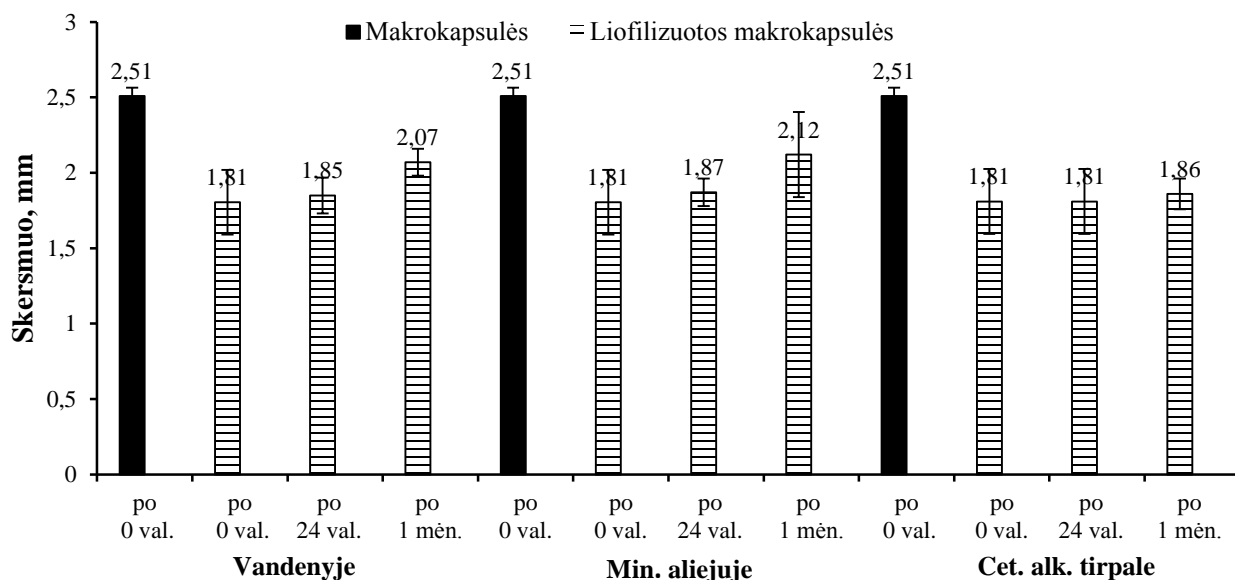


3.11 pav. Alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulių dydis, mm.

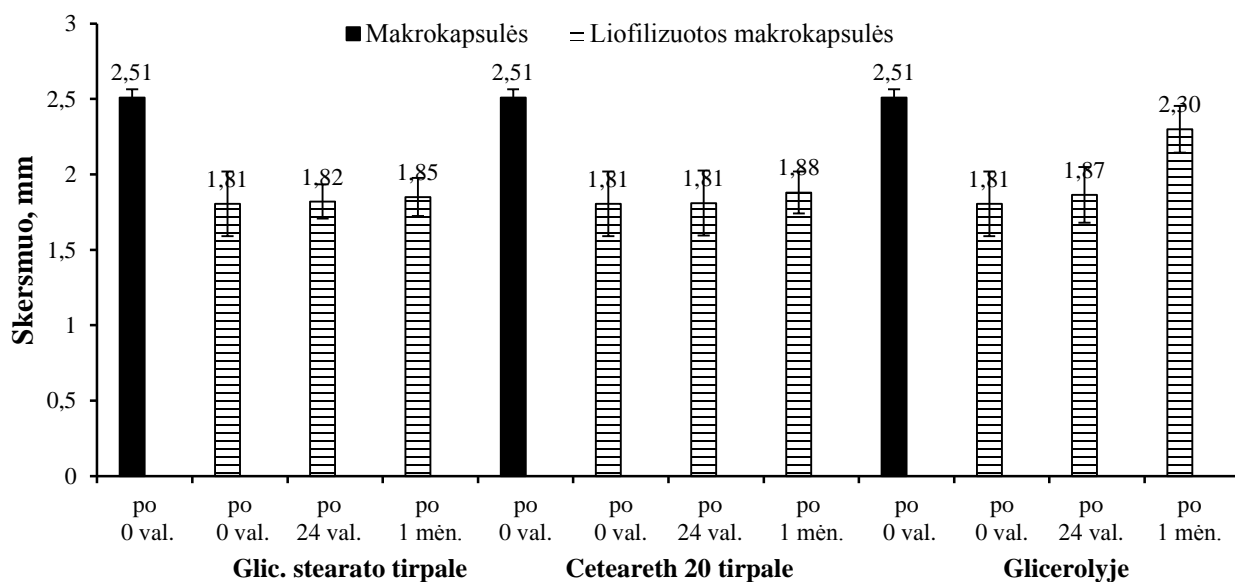


3.12 pav. Alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulių dydis, mm

Alginate:HEC (1:2,3) makrokapsulių dydis pateiktas 3.11 ir 3.12 paveiksluose. Iš gautų duomenų matyti, kad po liofilizacijos dydis sumažėjo 17 %. Taip pat nustatyta, kad liofilizuotų makrokapsulių dydis praktiškai nepasikeitė po 24 val. brinkinimo vandenyje, mineraliniame aliejuje, glicerolyje, tirpaluose su cetareth 20, cetearilo alkoholiu ir glicerolio stearatu. Panašus dydžio pokytis išliko ir po 1 mėn. brinkinimo tirpaluose su cetareth 20, cetearilo alkoholiu ir glicerolio stearatu priešingai nei vandenyje, mineraliniame aliejuje ir glicerolyje – šiuo atveju liofilizuotų kapsulių dydis vandenyje padidėjo 16 %, o mineraliniame aliejuje ir glicerolyje 10 %.



3.13 pav. Alginate:HEC (2,3:1) makrokapsulių dydis, mm



3.14 pav. Alginate:HEC (2,3:1) makrokapsulių dydis, mm

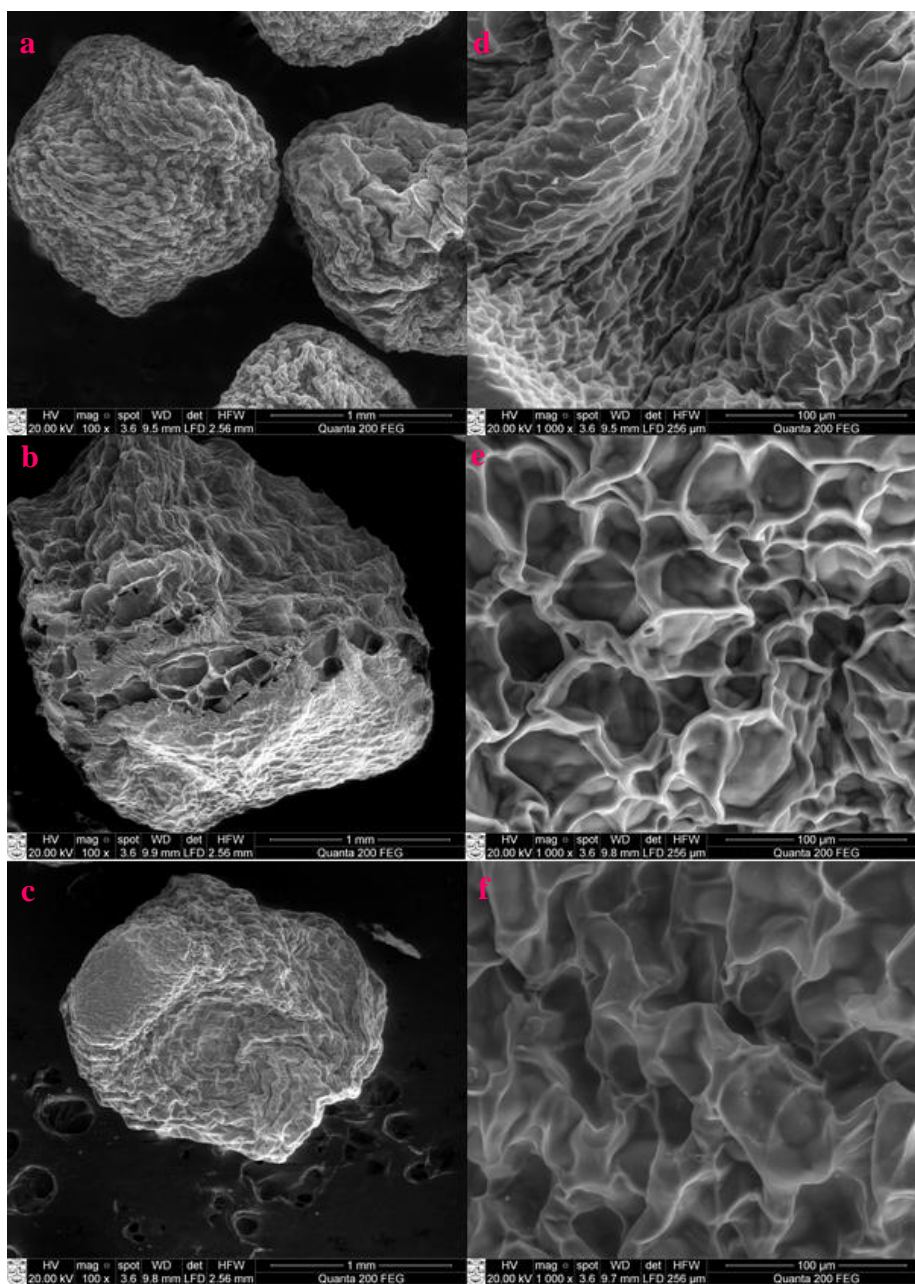
Alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulių dydis pateiktas 3.13 ir 3.14 paveiksluose. Iš gautų rezultatų pastebėta, kad, kaip ir prieš tai aptartų kapsulių rūšių, po liofilizacijos makrokapsulių dydis sumažėjo – šiuo atveju dydis sumažėjo 28 %. Taip pat nustatyta, kad liofilizuotų makrokapsulių dydis po brinkinimo tirpaluose su cetareth 20, cetearilo alkoholiu ir glicerolio stearatu išliko panašus. Reikšmingesnis liofilizuotų kapsulių dydžio pokytis nustatytas po 1 mėnesio brinkinimo glicerolyje – dydis padidėjo 27 %.

Apžvelgus gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad visų rūšių liofilizuotos makrokapsulės neįgyja savo pradinio būvio brinkinant įvairiose terpėse. Vadinasi, džiovinimo procesas yra dar vienas faktorius, turintis didelės reikšmės makrokapsulių dydžiui.

### **3.6 Liofilizuotų kapsulių morfologija**

Kapsulių morfologija tirta skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) metodu. Iš nuotraukų (žr. 3.15 pav. a, b, c) matyti, kad visų rūšių kapsulės po liofilizacijos netenka sferinės formos. Taip pat pastebėta, kad skiriasi išorinis paviršius. Kapsulių, kurių sudėtyje yra HEC, išorinis paviršius yra lygesnis nei alginato kapsulių.

Kapsulių porų dydis apskaičiuotas pasirinkus 20 atsitiktinių porų (žr. 3.16 pav. d, e, f). Iš gautų duomenų nustatyta, kad alginato kapsulių porų dydis siekia vidutiniškai 15  $\mu\text{m}$ , alginato:HEC (1:2,3) kapsulių – vid. 30  $\mu\text{m}$ , o alginato:HEC (2,3:1) kapsulių – vid. 20  $\mu\text{m}$ . Mažiausiomis poromis pasižymi alginato kapsulės, o kuo kapsulėse daugiau HEC, tuo didesnės jų poros.



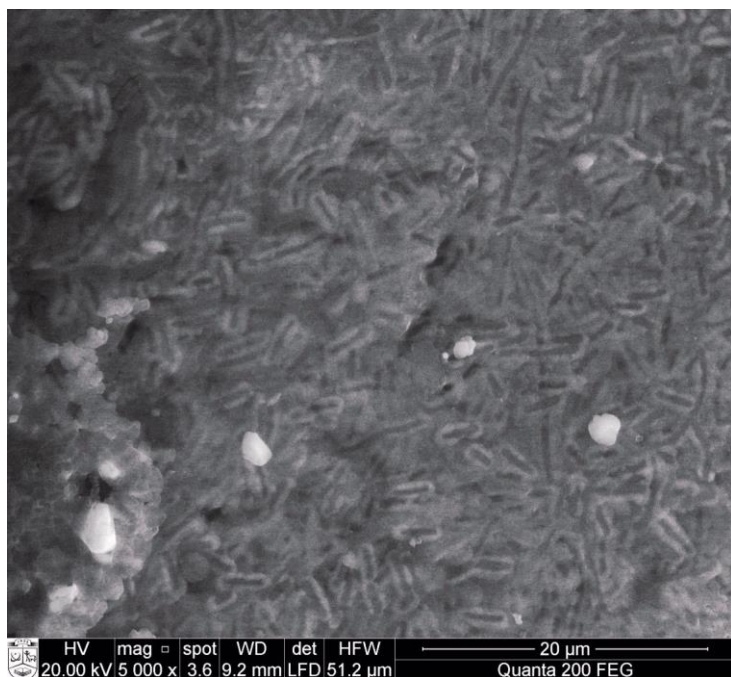
**3.15 pav.** Liofilizuotų kapsulių SEM vaizdas: a), d) alginato; b),e) alginato:HEC (1:2,3); c), f) alginato:HEC (2,3:1). Didinimas: 100x (a, b, c) ir 1000x (d, e, f).

Galima daryti išvadą, kad kapsulių morfologijai turi įtakos polimerų mišinio sudėtis.

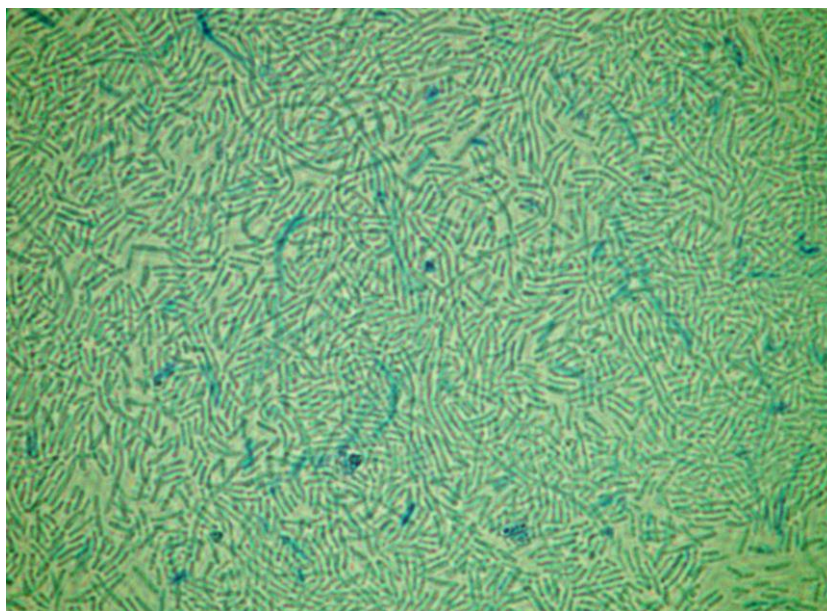
### 3.7 Bakterijų įkapsuliavimas

*L. plantarum* bakterijos kapsulėse imobilizuotos, įvedant bakterijų suspensiją į polimerų tirpalą, prieš formuojant iš jų kapsules. Siekiant įsitikinti, kad probiotines bakterijas pavyko

įkapsuliuoti, buvo atliekami mikroskopiniai tyrimai. 3.16 ir 3.17 paveiksluose pateikiamos įkapsuliuotų bakterijų nuotraukos, kuriose matyti lazdelės formos bakterijos.



**3.16 pav.** Alginato:HEC (1:2,3) kapsulėse įkapsuliuotų *L. plantarum* bakterijų SEM nuotraukos (5000x didinimas)



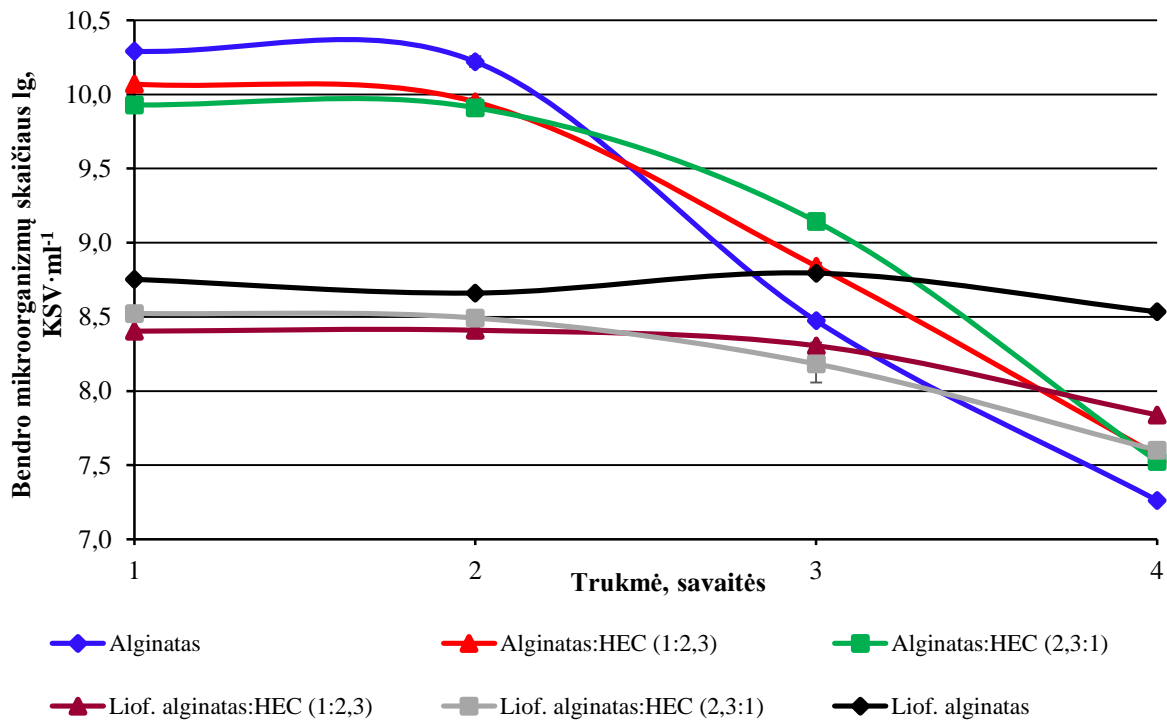
**3.17 pav.** Alginato:HEC (2,3:1) kapsulėse įkapsuliuotų *L. plantarum* bakterijų vaizdas, gautas su epifluorescenciniu mikroskopu (100x didinimas)

Taigi, galima daryti išvadą, kad ekstruzijos metodas yra tinkamas *L. plantarum* bakterijoms įkapsuliuoti, nes nuotraukose matyti nemažai bakterijų.

### 3.8 *Lactobacillus plantarum* gyvybingumas makrokapsulėse laikymo metu

Įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas makrokapsulėse buvo nustatomas jų laikymo metu, kadangi mikroorganizmai turi išgyventi ne tik gamybinių procesų, bet ir jų saugojimo metu. Šiam tyrimui atlikti neliofilizuotos ir liofilizuotos makrokapsulės su imobilizuotomis bakterijomis buvo laikomos 4 savaites 5 °C temperatūroje ir kas savaitę buvo tiriamas bakterijų gyvybingumas.

3.18 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad bakterijų gyvybingumas po liofilizacijos žymiai sumažėja – alginato ir alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulėse įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas sumažėjo per 1,5 lg KSV ml<sup>-1</sup>, o alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulėse per 1,4 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Pastebėta, kad tiek neliofilizuotose, tiek liofilizuotose makrokapsulėse įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas po savaitės laiko nepakito. Prasidėjus trečiai savaitei, visų rūšių neliofilizuotose makrokapsulėse bakterijų gyvybingumas sumažėjo – alginato makrokapsulėse per 1,7 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato:HEC (1:2,3) 1,1 lg KSV ml<sup>-1</sup>, o alginato:HEC (2,3:1) 0,7 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Tuo tarpu liofilizuotose makrokapsulėse, kurių sudėtyje yra HEC, po trijų savaičių gyvybingų bakterijų skaičius (KSV) nežymiai sumažėjo, o liofilizuotose alginato kapsulėse šiek tiek padidėjo. Tačiau praėjus dar vienai savaitei, tiek liofilizuotose, tiek neliofilizuotose visų rūšių makrokapsulėse bakterijų gyvybingumas toliau mažėjo.



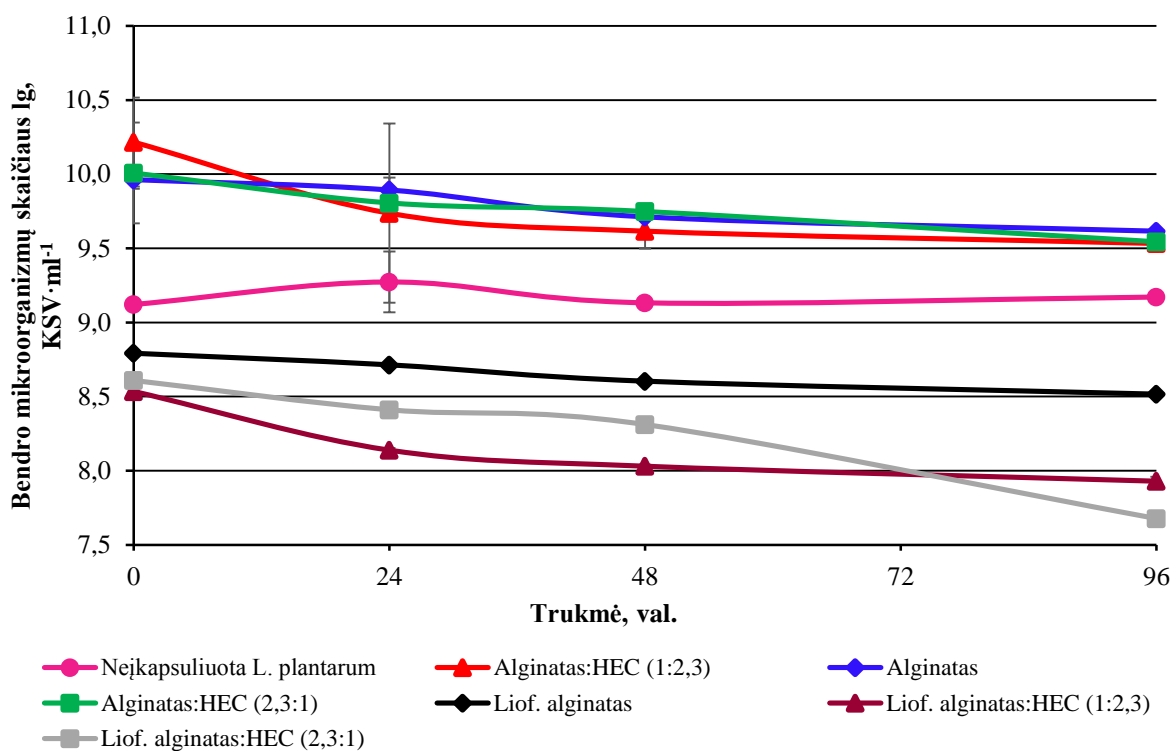
3.18 pav. *L. plantarum* gyvybingumas neliofilizuotose ir liofilizuotose makrokapsulėse laikymo metu



Akivaizdu, kad probiotinių bakterijų gyvybingumas labai priklauso nuo džiovavimo proceso.

### 3.9 Glicerolio stearato poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms *Lactobacillus plantarum* bakterijoms

Glicerolio stearatas vienas iš dažniausiai naudojamų emulsiklių ir minkštiklių asmens priežiūros priemonėse. Siekiant ištirti šio emulsiklio poveikį neįkapsuliuotoms ir įkapsuliuotoms *L. plantarum* bakterijoms, tyrimams buvo paruoštas 5 % glicerolio stearato tirpalas mineraliniame aliejuje, į kurio vieną dalį buvo įpilta 1 ml grynos kultūros, o į kitą dalį buvo įdėta 1 g makrokapsulių su *L. plantarum* kultūra. Gyvybingų *L. plantarum* bakterijų skaičius buvo nustatomas po 0; 24; 48 ir 96 valandų.



#### 3.19 pav. Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas glicerolio stearato tirpale

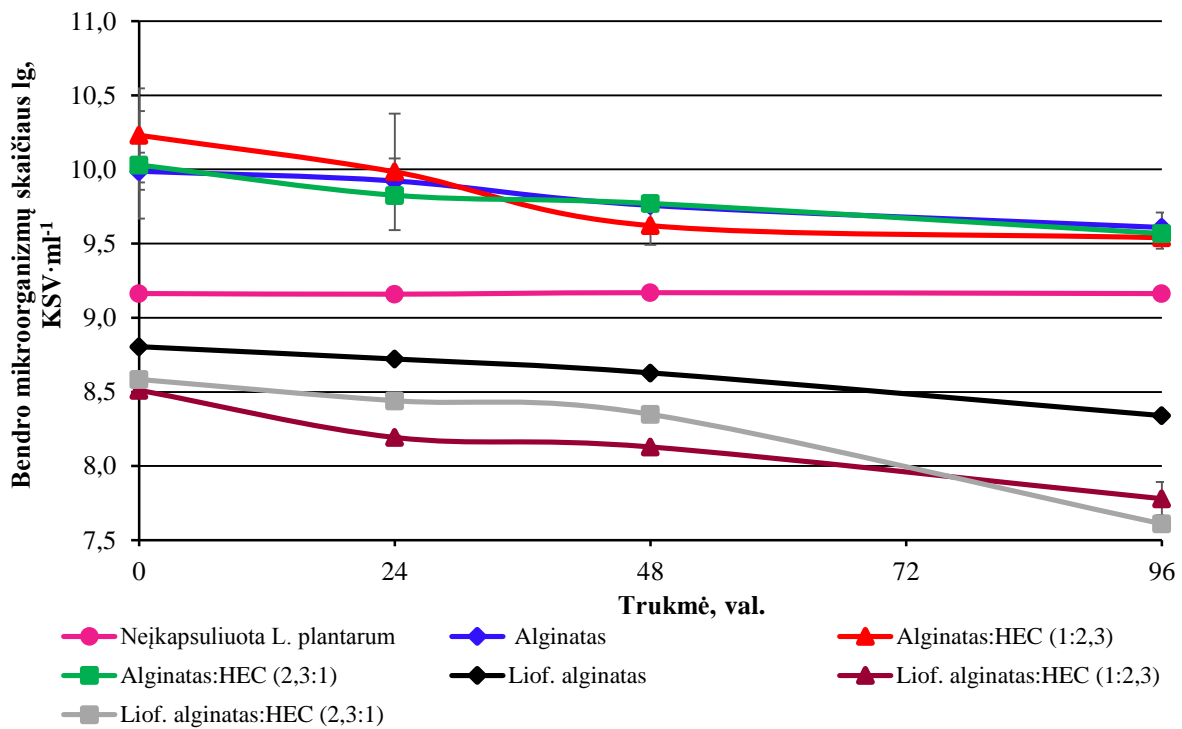
Pasak literatūros šaltinių, įkapsuliuojimo ir imobilizavimo metodai padidina probiotinių bakterijų gyvybingumą ir stabilumą. 3.19 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad įkapsuliuotų bakterijų skaičius, paveikus jas 5 % glicerolio stearato tirpalu, po 24 val. neliofilizuotose visų rūšių makrokapsulėse išties yra didesnis, lyginant su neįkapsuliuotos kultūros. Gyvybingumo lg KSV ml<sup>-1</sup> alginato ir alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulėse padidėjo per 0,6, o alginato:HEC (1:2,3) per 0,5. Tuo tarpu visų rūšių liofilizuotose makrokapsulėse bakterijų gyvybingumas po 24 val. yra mažesnis, lyginant su nekapsuliuota kultūra – alginato kapsulėse bakterijų kiekis sumažėjo nuo 9,2 lg KSV ml<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> iki 8,7 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato-HEC (2,3:1) iki 8,4 lg KSV ml<sup>-1</sup> ir alginato-HEC (1:2,3) iki 8,1 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Nustatyta, kad visą likusį tyrimo laiką (72 val.) įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas visų rūšių kapsulėse nežymiai mažėjo, išskyrus liofilizuotose alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulėse – po 48 val. pastebėtas staigesnis gyvybingumo sumažėjimas. Lyginant neįkapsuliuotą kultūrą su įkapsuliuota, gyvybingų mikroorganizmų skaičius po 48 val. išliko pastovus iki pat tyrimo pabaigos.

Remiantis gautais duomenimis, galima daryti išvadą, kad 5 % koncentracijos glicerolio stearatas nepasižymi antimikrobinio aktyvumu. Kad tokios koncentracijos glicerolio stearatui nebūdingas antimikrobinis poveikis, tvirtina ir mokslininkai J. J. Kabara ir D. S. Orth [65]. Literatūros šaltiniuose taip pat rasta duomenų, kad taikant mikrokapsuliuavimo techniką, glicerolio monostearatas yra viena iš įkapsuliuojančių medžiagų, kuri kartu su kukurūzų krakmolu naudojama įkapsuliuojant tiriamąsias *L. plantarum* [66].

### 3.10 Cetearilo alkoholio poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms *Lactobacillus plantarum* bakterijoms

Cetearilo alkoholis – tai riebalų alkoholis, plačiai naudojamas kosmetikos priemonėse kaip emulsiklis, minkštiklis, emulsijų stabilizatorius ir klampumą reguliuojanti medžiaga. Pasak literatūros šaltinių, jis dažnai derinamas kartu su glicerolio stearatu [67].



3.20 pav. Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas cetearilo alkoholio tirpale

Siekiant iširti 4 % cetearilo alkoholio poveikį neįkapsuliuotai ir įkapsuliuotai *L. plantarum* kultūrai, tyrimai buvo atlikti tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir su glicerolio stearato tirpalu. Iš gautų duomenų (žr. 3.20 pav.) pastebėta, kad šio emulsiklio poveikis probiotikų gyvybingumui labai panašus į glicerolio stearato poveikį (žr. 3.19 pav.) Iš karto po nekapsuliuotos kultūros kontakto (0 val.) su tiriamą medžiaga gyvybingų bakterijų skaičiaus logaritmas buvo 9,1 kaip ir po glicerolio stearato kontakto su neįkapsuliuota *L. plantarum*.

Tokie pat rezultatai gauti ir su įkapsuliuota kultūra – atitinkamai alginato kapsulėse bakterijų kiekis po 0 val. buvo 9,9 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato:HEC (2,3:1) 10,0 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato:HEC (1:2,3) 10,2 lg KSV ml<sup>-1</sup>, liofilizuotose alginato:HEC (1:2,3) 8,5 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Tuo tarpu liofilizuotose alginato ir alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulėse gyvybingų bakterijų skaičius po 0 val. cetearilo alkoholio tirpale skyrėsi per 0,1 lg KSV ml<sup>-1</sup>, lyginant su gyvybingumu glicerolio stearato tirpale. Ryškiausias cetearilo alkoholio poveikio skirtumas yra tas, kad neįkapsuliuotos *L. plantarum* gyvybingumas visą tyrimo laikotarpį nekito.

Nepaisant pastebėtų kelių mikroorganizmų gyvybingumo skirtumų, atlikti tyrimai parodė, kad įkapsuliuojimas padidina probiotinių bakterijų gyvybingumą, o liofilizaciją jį sumažina. Taip pat nustatyta, kad cetearilo alkoholio antimikrobinis poveikis yra nežymus, ką teigia ir mokslinė literatūra. Mokslininkai Thiemann ir Petersen–Straetmans tirdami emulsiklių mišinių konservuojančias savybes A/V emulsijose, nustatė, kad dauguma emulsiklių pasižymi antimikrobinu aktyvumu prieš *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 12231) ir *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Dviejų emulsiklių mišinių, sudarytų iš vienodo kiekio cetearilo alkoholio ir skirtingo kiekio cetearilo gliukozido, tyrimai parodė, kad antimikrobinu poveikiu pasižymi cetearilo gliukozidas, o ne cetearilo alkoholis [68].

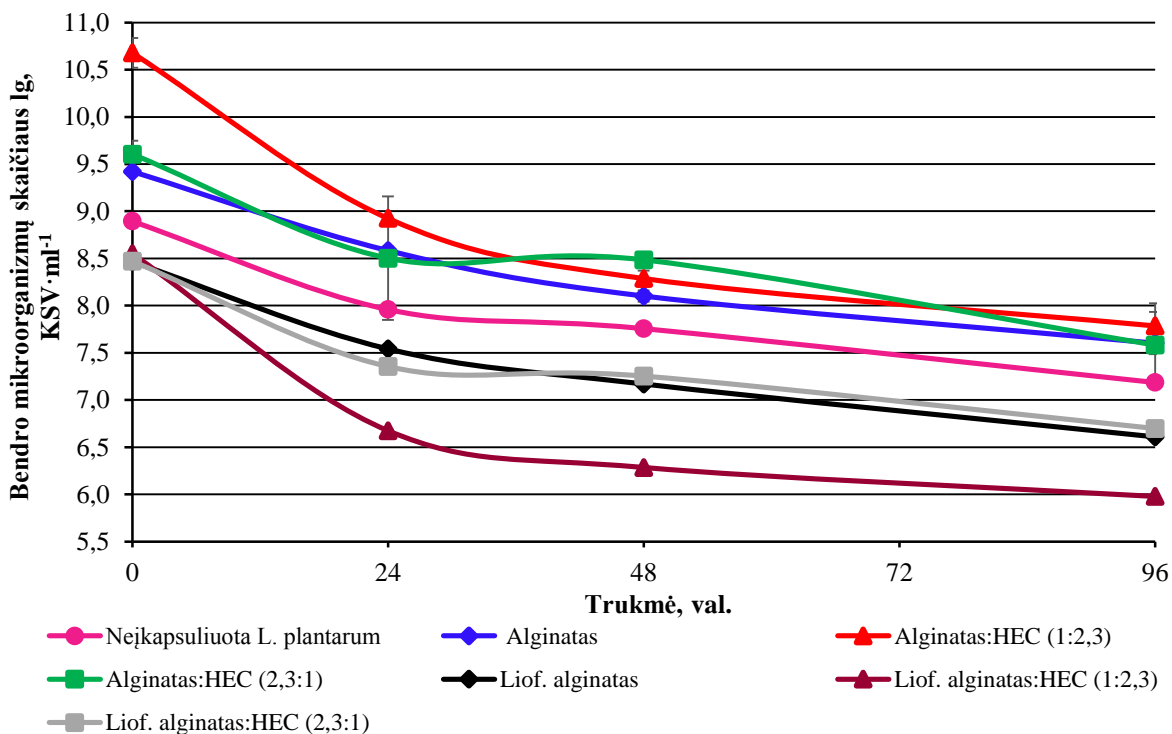
### **3.11 Cetareth 20 poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms *Lactobacillus plantarum* bakterijoms**

Cetareth 20 – tai dar vienas emulsiklis, kuris yra neatsiejama kosmetikos priemonių dalis. Analizuojant šio emulsiklio įtaką probiotinių bakterijų gyvybingumui, tyrimai atlikti tomis pačiomis sąlygomis kaip ir su prieš tai minėtais emulsikliais.

Iš gautų rezultatų (žr. 3.21 pav.) matyti, kad cetareth 20 pasižymi stipresniu antimikrobinu poveikiu, lyginant su glicerolio stearatu ir cetearilo alkoholiu. Nustatyta, kad neįkapsuliuotą *L. plantarum* paveikus 3,5 % cetareth 20 tirpalu gyvybingumas po 96 val. sumažėjo per 2 lg KSV ml<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, lyginant su gyvybingų bakterijų skaičiumi tirpaluose su glicerolio stearatu (žr. 3.19 pav.) ir cetearilo alkoholiu (žr. 3.20 pav.).

Ženklus mikroorganizmų gyvybingumo sumažėjimas taip pat pastebėtas visų rūšių kapsulėse, jas paveikus cetareth 20 tirpalu, tyrimo pabaigoje, t.y. gyvybingumo logaritmas nuo tyrimo pradžios iki pabaigos alginato, liofilizuotose alginato ir alginato:HEC (2,3:1) kapsulėse sumažėjo 1,8 vieneto, alginato:HEC (2,3:1) 2,1 vieneto, alginato:HEC (1:2,3) 2,9 vieneto, o liofilizuotose alginato:HEC (1:2,3) kapsulėse 2,6 vieneto.



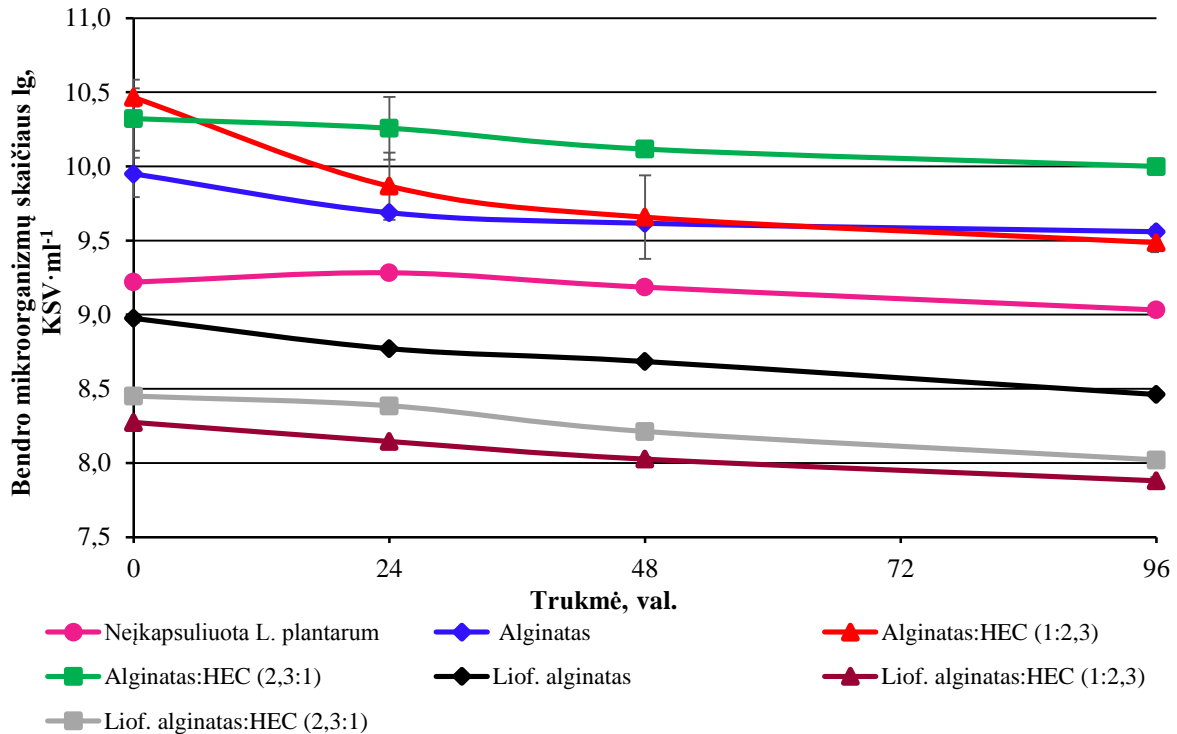
### 3.21 pav. Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas cetareth 20 tirpale

Nors tiek neįkapsuliuotos, tiek įkapsuliuotos kultūros gyvybingumas žymiai sumažėja paveikus cetareth 20, tačiau, lyginant rezultatus tarpusavy, matyti, kad įkapsuliuavimas padidina bakterijų gyvybingumą. Tuo tarpu kapsulių liofilizavimas probiotikų gyvybingumą sumažina.

Duomenų apie cetareth 20 antimikrobinį poveikį literatūroje nepateikiama, tačiau galima daryti prielaidą, kad antimikrobinis aktyvumas pasireiškia dėl stipresnių emulguojančių savybių, palyginus su cetearilo alkoholiu ar glicerolio stearatu.

### 3.12 Glicerolio poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms *Lactobacillus plantarum* bakterijoms

Glicerolis dėl savo drėkinančių savybių paprastai yra pagrindinis daugelio kosmetikos priemonių ingredientas. Šios medžiagos poveikis bakterijų gyvybingumui ištirtas analogiškomis sąlygomis kaip ir emulsiklių.



**3.22 pav.** Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas glicerolyje

3.22 pav pateikti duomenys rodo, kad iš karto po grynos kultūros kontakto su 2 % gliceroliu gyvybingų bakterijų skaičius buvo 9,2 lg KSV ml<sup>-1</sup> ir išliko nepakitęs dar 24 val., tačiau po to pradėjo mažėti. Tuo tarpu visų rūšių kapsulėse gyvybingumas tendencingai mažėjo iki pat tyrimo pabaigos.

Taip pat aptikta, kad, lyginant su neįkapsuliuota kultūra, didžiausias mikroorganizmų gyvybingumas išlieka alginato-HEC (2,3:1) kapsulėse, o mažiausias – liofilizuotose alginato-HEC (1:2,3) kapsulėse.

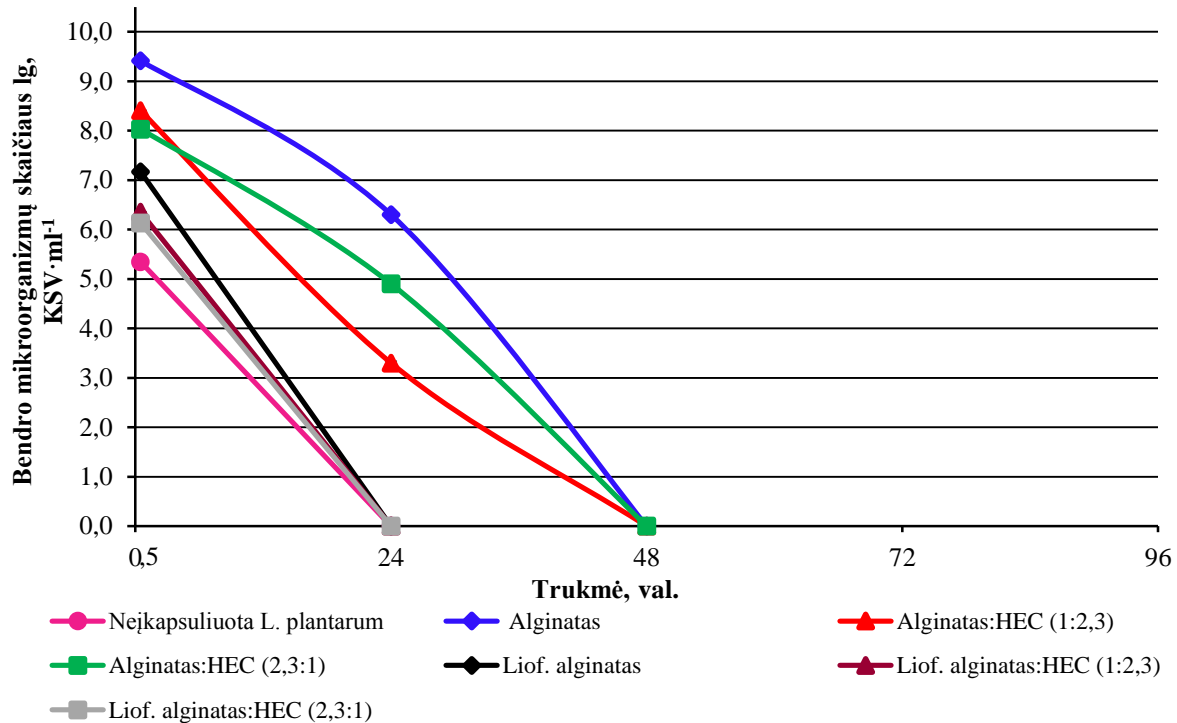
Galima daryti išvadą, kad glicerolio antimikrobinis aktyvumas prieš *L. plantarum* yra nežymus, kadangi gyvybingų bakterijų skaičiaus logaritmas kito 1 lg KSV ml<sup>-1</sup> ribose. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad glicerolis plačiai naudojamas ir kaip bakterijų krioprotektantas, kuris padeda palaikyti probiotinių ląstelių gyvybingumą liofilizacijos metu [69,70]. Literatūroje randama

informacija, kad glicerolis pasižymi bakteriostatinėmis savybėmis, tačiau nėra bakteriocidas, neretai naudojamas farmacijos pramonėje [71, 72].

### 3.13 Konservantų poveikis įkapsuliuotoms ir neįkapsuliuotoms *Lactobacillus plantarum* bakterijoms

Kosmetikos produktų neįmanoma įsivaizduoti be konservantų. Šiems tyrimams pasirinkti ne sintetiniai, o natūralūs konservantai, kurie laikomi saugesniais, mažiau toksiškais ir mažiau kenksmingais žmogaus sveikatai.

Benzoinė rūgštis yra laikoma natūralia antimikrobine medžiaga, nes gaunama iš natūralių šaltinių [73]. Šios medžiagos poveikis bakterijų gyvybingumui ištirtas analogiškomis sąlygomis kaip ir prieš tai minėtų medžiagų.

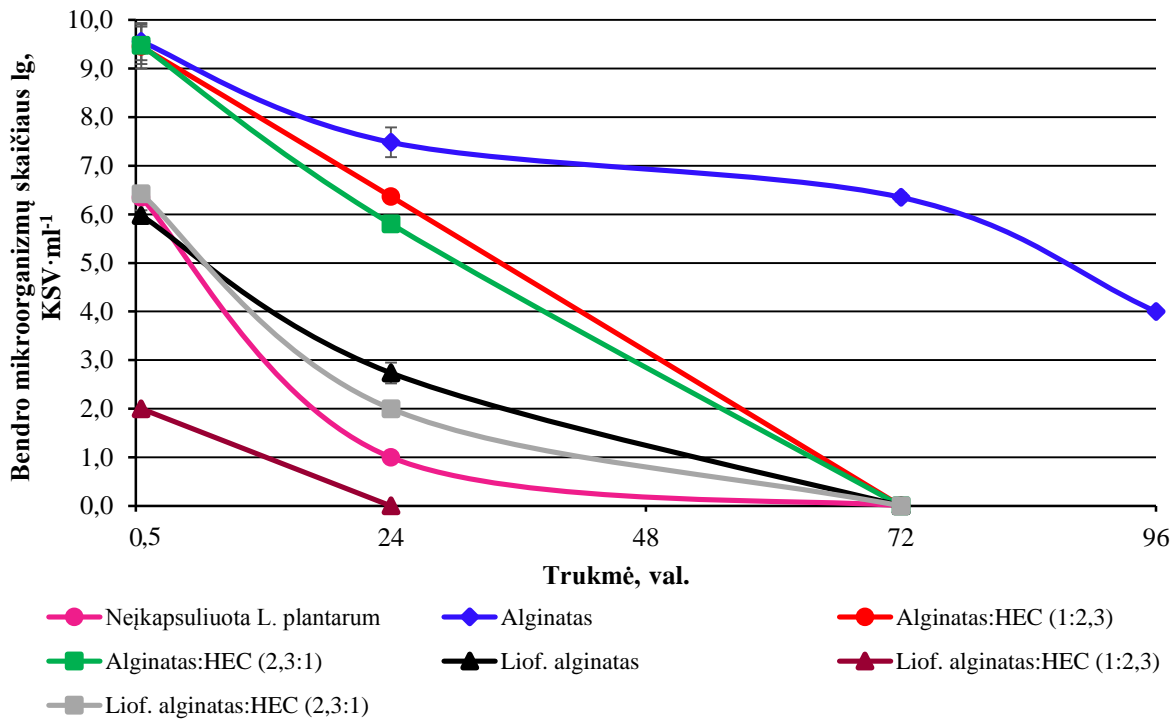


3.23 pav. Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas 0,5 % benzoinės rūgšties tirpale

Ištyrus 0,5 % benzoinės rūgšties įtaką probiotikų gyvybingumui, nustatytas stiprus šio konservanto antimikrobinis poveikis (žr. 3.23 pav.). Neįkapsuliuotos bakterijos ir visų rūšių liofilizuotose kapsulėse esančios bakterijos žuvo po 24 val. Nors neliofilizuotose visų rūšių kapsulėse bakterijos buvo gyvybingos ilgesnį laiko tarpą (48 val.) nei liofilizuotose (24 val.), tačiau jos taip pat žuvo.

Vadinasi, galima daryti išvadą, kad 0,5 % koncentracija yra per didelė šioms bakterijoms, o kapsulių sudėtis yra netinkama tiriamajai kultūrai įkapsuliuoti.

Siekiant įsitikinti, ar bakterijos žuvo dėl per stiprios konservanto koncentracijos, buvo paruoštas silpnesnės 0,1 % koncentracijos benzoinės rūgšties tirpalas ir ištirtas jo poveikis neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumui.

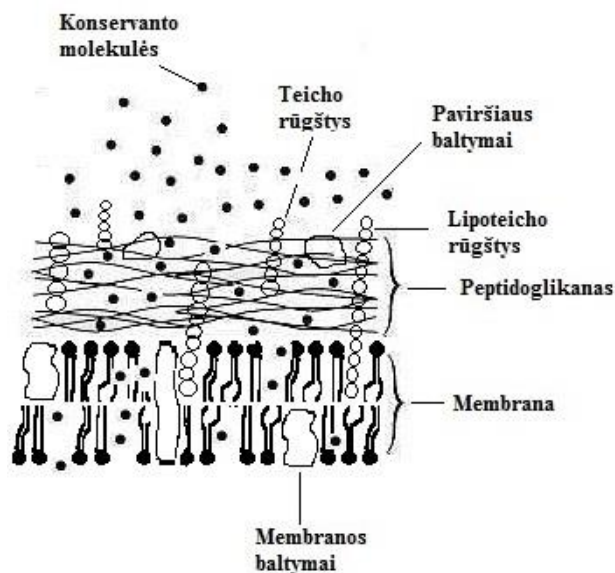


**3.24 pav.** Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas 0,1 % benzoinės rūgšties tirpale

Iš gautų rezultatų (žr. 3.24 pav.) matyti, kad neįkapsuliuotos bakterijos, liofilizuotose alginato:HEC (2,3:1) ir liofilizuotose alginato kapsulėse esančios bakterijos, o taip pat alginato:HEC (1:2,3) ir alginato:HEC (2,3:1) kapsulėse esančios bakterijos, paveikus jas 0,1 % koncentracijos benzoine rūgštimi išliko gyvybingos ilgesnį laiko tarpą (72 val.) nei paveikus 0,5 % benzoinės rūgšties tirpalu. Taip pat pastebėta, kad alginato kapsulėse įkapsuliuotos bakterijos nežuvo per visą tyrimo laikotarpį, t.y. 96 val., tačiau jų gyvybingumas po 96 val. tesiekė 4 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Tuo tarpu *L. plantarum* bakterijos, esančios liofilizuotose alginato:HEC (1:2,3) kapsulėse, žuvo po 24 val. kaip ir paveikus 0,5 % benzoinės rūgšties tirpalu.

Taigi, galima daryti išvadą, kad benzoinė rūgštis yra netinkamas konservantas kosmetikos priemonėse su probiotikais. Be to, gauti rezultatai tik patvirtino literatūros šaltiniuose teigiamą informaciją, kad benzoinė rūgštis pasižymi stipriu antimikrobinu aktyvumu prieš gramteigiamas

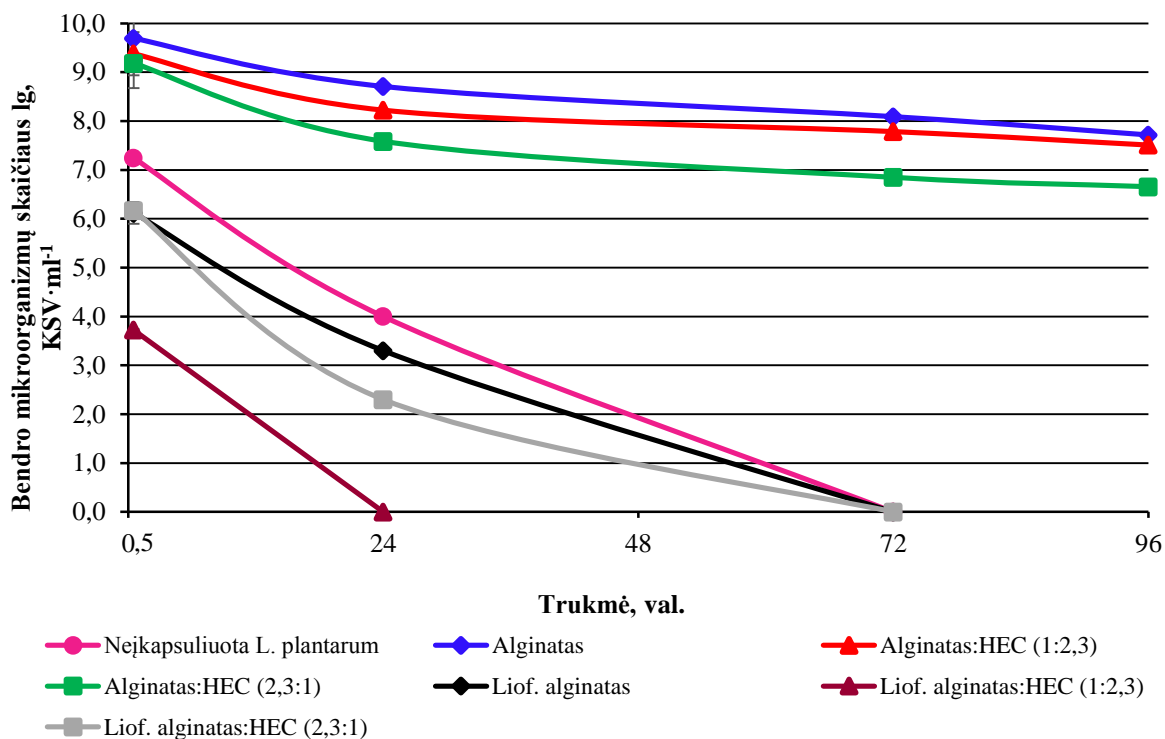
bakterijas [74,75]. Gramteigiamos bakterijos neturi išorinės membranos kaip gramneigiamos bakterijos, todėl benzoinės rūgšties molekulės daug lengviau prasiskverbia per peptidoglikano sluoksnį ir nesunkiai destabilizuoja ląstelės membraną. Gramteigiamų bakterijų membranos suardymas pateiktas 3.25 paveiksle.



**3.25 pav.** Gramteigiamų bakterijų membranos suardymo schema

Kadangi benzoinė rūgštis kaip antimikrobinė medžiaga šiuo atveju yra netinkama, tolesniems tyrimams pasirinktas kitas konservantas – tai Sensicare M 4200, kurio veiklioji medžiaga yra natrio benzoatas su gliukonolaktonu. Anot literatūros, benzoinės rūgšties druska pasižymi antimikrobinio aktyvumu prieš bakterijas, grybus ir mieles [76].





**3.26 pav.** Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas 0,25 % Sensicare M 4200 tirpale

Iš atliktų tyrimų (žr. 3.26 pav.) paaiškėjo, kad šios antimikrobinės medžiagos poveikis yra panašus kaip ir 0,1 % koncentracijos benzoinės rūgšties. Neįkapsuliuotos bakterijos, liofilizuotose alginato:HEC (2,3:1) ir liofilizuotose alginato kapsulėse esančios bakterijos paveikus 0,25 % koncentracijos Sensicare M 4200 žuvo po 72 val., o liofilizuotose alginato:HEC (1:2,3) kapsulėse esančios bakterijos žuvo po 24 val. kaip ir paveikus 0,1 % benzoinės rūgšties tirpalu. Tačiau, priešingai gautiems rezultatams su 0,1 % ir 0,5 % koncentracijos benzoinės rūgšties tirpalais, neliofilizuotose visų rūšių kapsulėse esančios bakterijos išliko gyvybingos visu tiriamuoju laikotarpiu.

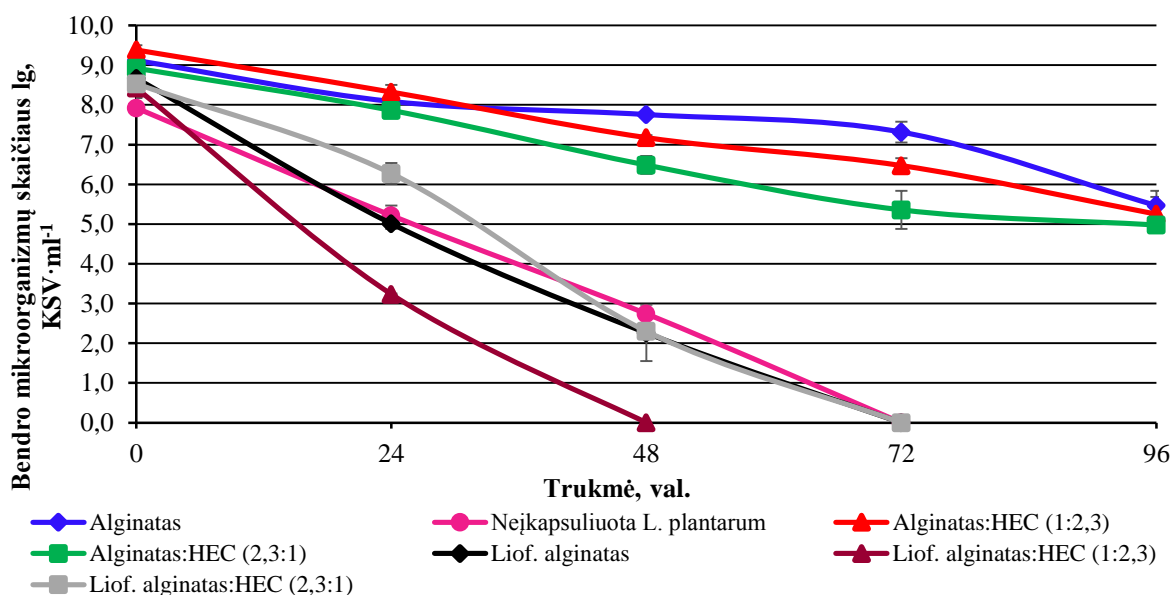
Remiantis rezultatais, matyti, kad per pirmas 24 val. alginato makrokapsulėse įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas sumažėjo nuo 9,6 lg KSV ml<sup>-1</sup> iki 8,7 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato:HEC (2,3:1) makrokapsulėse nuo 9,1 lg KSV ml<sup>-1</sup> iki 7,5 lg KSV ml<sup>-1</sup>, o alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulėse nuo 9,3 lg KSV ml<sup>-1</sup> iki 8,2 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Tai pat pastebėta, kad visą likusį tyrimo laiką (72 val.) įkapsuliuotų bakterijų kiekis visų rūšių kapsulėse toliau mažėjo ir po 96 val. siekė 7,7 lg KSV ml<sup>-1</sup> alginato makrokapsulėse, 6,6 lg KSV ml<sup>-1</sup> alginato-HEC (2,3:1) ir 7,5 lg KSV ml<sup>-1</sup> alginato:HEC (1:2,3) makrokapsulėse.

Apžvelgus gautus rezultatus, galima teigti, jog tiek kapsulių sudėtis, tiek kapsuliavimo technologija yra tinkami *L. plantarum* bakterijoms įkapsuliuoti. Nors liofilizuotas kapsules yra patogiau vartoti, tačiau šiuo atveju liofilizacijos procesas yra nepageidaujamas, nes jis neapsaugo bakterijų nuo antimikrobinio konservantų poveikio. To priežastimi, matomai, yra po liofilizacijos padidėjęs kapsulių porų dydis, todėl mažoms konservanto molekulėms nesunku patekti į kapsulės vidų. Tai ypač svarbu naudojant įkapsuliavime HEC, nes, anot literatūros, HEC padidina poras alginato matricoje [77]. Vadinasi, atlikus liofilizaciją kapsulių, kurių sudėtyje yra HEC, porų dydis dar padidėja ir mažos konservanto molekulės lengvai prasiskrebia į vidų.

### 3.14 Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *Lactobacillus plantarum* gyvybingumas laikymo kreme metu

Ištyrus atskirų kosmetikos komponentų įtaką probiotikų gyvybingumui, būtina žinoti ir šių bakterijų sąveiką su visais ingredientais kartu, nes kelių medžiagų mišinys kosmetinės priemonės sudėtyje gali veikti sinergistiškai ir tokiu būdu dar labiau slopinti mikroorganizmus arba padidinti jų gyvybingumą.

Siekiant ištirti neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumą laikymo kreme metu, tyrimams buvo pagamintas kremas pagal receptūrą, nurodytą 2.2.11 skyrelyje. Tada į vieną dalį kremo buvo įpilta 1 ml grynos kultūros, o į kitą dalį buvo įdėta 1 g makrokapsulių su *L. plantarum* kultūra. Gyvybingų *L. plantarum* bakterijų skaičius buvo nustatomas po 0; 24; 48; 72 ir 96 valandų.



3.27 pav. Neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų *L. plantarum* gyvybingumas laikymo kreme metu

3.27 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad liofilizacija panaikina makrokapsulių apsauginį poveikį, nes visi mikroorganizmai žuvo. Nustatyta, kad neįkapsuliuotos bakterijos, liofilizuotose alginato:HEC (2,3:1) ir liofilizuotose alginato kapsulėse esančios bakterijos žuvo po 72 val., o liofilizuotose alginato:HEC (1:2,3) kapsulėse esančios bakterijos žuvo po 48 val. Tuo tarpu neliofilizuotose makrokapsulėse esančios bakterijos buvo gyvybingos visu tiriamuoju laikotarpiu.

Lyginant neįkapsuliuotą kultūrą su įkapsuliuota, matyti, kad gyvybingų mikroorganizmų skaičius po įkapsuliuavimo padidėjo visų rūšių makrokapsulėse – alginato kapsulėse 1,2 vieneto, alginato:HEC (1:2,3) 1,4 vieneto, o alginato:HEC (2,3:1) 1 vieneta. Praėjus 24 val. nuo tyrimo pradžios, bakterijų gyvybingumas visų tipų kapsulėse sumažėjo 1 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Nepaisant to, kad per kitas 48 val. gyvybingų bakterijų kiekis visų rūšių kapsulėse mažėjo skirtingai (tai lėčiau, tai greičiau), po 96 val. jų skaičius buvo panašus – alginato kapsulėse gyvybingumo logaritmas siekė 5,4 lg KSV ml<sup>-1</sup>, alginato:HEC (1:2,3) 5,2 lg KSV ml<sup>-1</sup>, o alginato:HEC (2,3:1) 4,9 lg KSV ml<sup>-1</sup>. Atlikus tyrimus po ilgesnio laiko tarpo (po 1 mėnesio), pastebėta, kad visų rūšių neliofilizuotose kapsulėse bakterijų gyvybingumas tik nežymiai sumažėjo, vadinasi, bakterijos sugebėjo prisitaikyti prie aplinkos.

Remiantis rezultatais, matyti, kad įkapsuliuavimas apsaugo nuo natūralaus konservanto antimikrobinio poveikio, nes įkapsuliuotos bakterijos išliko gyvybingos visu tiriamuoju laikotarpiu.

### **3.15 Įkapsuliuotų *Lactobacillus plantarum* bakterijų atsipalaidavimas ir efektyvumas**

Bakterijų atsipalaidavimas ant odos paviršiaus, tepant kremą, svarbus tyrimas, patvirtinantis, ar atliktas darbas buvo sėkmingas. Šis tyrimas parodo, ar pagamintos kapsulės savo savybėmis ne tik yra tinkamos pritaikomumui kosmetikoje, bet ir efektyviai išsaugo probiotinių bakterijų gyvybines funkcijas.

Įkapsuliuotų *L. plantarum* bakterijų atsipalaidavimas ištirtas ir apskaičiuotas pagal metodiką, nurodytą 2.2.10 skyrelyje. Duomenims palyginti apskaičiuotas įkapsuliuavimo efektyvumas (E) % pagal literatūroje nurodytą formulę [78, 79, 80]:

$$E = \left( \frac{\text{Log}_{10}N}{\text{Log}_{10}N_0} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$N$  – bakterijų skaičius prieš įkapsuliuavimą (vandeninėje suspensijoje);

$N_0$  – bakterijų skaičius po įkapsuliuavimo (kapsulės vandenyje).

**3.2 lentelė.** Įkapsuliavimo efektyvumas ir bakterijų atsipalaidavimas ant odos

Kapsulių sudėtis	Efektyvumas,%	Atsipalaidavimas,%
Alginatas	96	52
Alginatas:HEC (1:2,3)	98	80
Alginatas:HEC (2,3:1)	97	64

3.2 lentelėje pateikti įkapsuliavimo efektyvumo rezultatai rodo, kad tiek pasirinktas įkapsuliavimo metodas, tiek pasirinktos įkapsuliuojančios medžiagos yra tinkamos *L. plantarum* bakterijoms įkapsuliuoti, kadangi visų rūšių kapsulėse efektyvumas viršija 95 %.

Iš bakterijų atsipalaidavimo rezultatų matyti, kad mažiausiai probiotinių bakterijų atsipalaidavo iš alginato kapsulių – tik 52 %, o daugiausiai – net 80 % iš kapsulių, kurių sudėtyje yra daugiausiai HEC. Pastarosiose apskaičiuotas ir didžiausias efektyvumas.

Galima daryti išvadą, kad tinkamiausios kapsulės pritaikomumui kosmetikoje yra tos, kurių sudėtyje yra daugiausiai HEC.

## IŠVADOS

1. *Lactobacillus plantarum* augimo kreivėse, gautose terpėse su skirtingomis pH reikšmėmis, nustatyta, kad bakterijos neauga, esant terpės pH 3. Ilgiausia lag fazė (9 val.) stebima, esant pH 4 ir 9, o trumpiausia (4 val.), esant pH 7 ir 8. Terpėse, kurių pH reikšmės 5, 6, 7, 8 ir 9 stacionari augimo fazė prasidėjo tuo pačiu laiku – po 19 val.
2. Iš natrio alginato, pektino ir hidroksietilceliuliozės ekstruzijos būdu pagamintos skirtingos sudėties kapsulės, kurios skiriasi savo forma ir savybėmis.
3. Mechaninių savybių tyrimai parodė, kad mažiausiu kietumu pasižymi alginato-pektino-hidroksietilceliuliozės (svorių santykiu 1:1:2) ir alginato-hidroksietilceliuliozės (1:2,3) kapsulės, o didžiausiu – alginato kapsulės.
4. Liofilizuotų kapsulių morfologijos tyrimai parodė, kad visų rūšių kapsulės po liofilizacijos netenka sferinės formos. Mažiausias porų dydis nustatytas alginato kapsulėse (vid. 15  $\mu\text{m}$ ), o didžiausias alginato-hidroksietilceliuliozės (1:2,3) kapsulėse (vid. 30  $\mu\text{m}$ ).
5. Nustatyta, kad liofilizacija gyvybingų bakterijų skaičių sumažina – alginato ir alginato-hidroksietilceliuliozės (1:2,3) kapsulėse įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas sumažėjo 1,5 lg KSV  $\text{ml}^{-1}$ , o alginato-hidroksietilceliuliozės (2,3:1) kapsulėse 1,4 lg KSV  $\text{ml}^{-1}$ . Pastebėta, kad laikant 5 °C temperatūroje *Lactobacillus plantarum* bakterijų gyvybingumo sumažėjimas yra staigesnis neliofilizuotose kapsulėse nei liofilizuotose.
6. 5 % glicerolio stearatas, 4 % cetearilo alkoholis ir 2 % glicerolis neturėjo reikšminės įtakos probiotikų gyvybingumui. Tuo tarpu 3,5 % cetareth 20 pasižymi stipresniu antimikrobinu poveikiu dėl stipresnių emulguojančių savybių.
7. Natūralūs konservantai turėjo reikšmingos įtakos neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotos bakterijų gyvybingumui. Nustatyta, kad paveikus 0,25 % Sensicare M 4200 (natrio benzoatu su gliukonolaktonu) konservantu neliofilizuotose visų rūšių kapsulėse esančios bakterijos išliko gyvybingos visu tiriamuoju laikotarpiu.
8. Pagaminti kremas ir pienelis su probiotikais. Ištyrus neįkapsuliuotų ir įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumą kreme, pastebėta, kad neįkapsuliuota kultūra ir visų rūšių liofilizuotose kapsulėse esančios bakterijos žuvo, o neliofilizuosose kapsulėse esančios bakterijos buvo gyvybingos visu tiriamuoju laikotarpiu.
9. Nustatyta, kad tepant kremą ant odos, mažiausiai probiotinių bakterijų atsipalaidavo iš alginato kapsulių (52 %), o daugiausiai iš alginato-hidroksietilceliuliozės (1:2,3) kapsulių (80 %).

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei prof., dr. J. Liesienei už didelę pagalbą rašant baigiamąjį darbą, doc. dr. A. Šipailienei už galimybę atlikti tyrimus mikrobiologijos laboratorijoje, laborantei R. Grigaliūnienei, lekt. dr. R. Žvirdauskienei, doktorantei S. Petraitytei už pagalbą atliekant tyrimus ir už suteiktą informaciją. Be šių žmonių paramos ir pagalbos nebūčiau parengusi šio darbo, todėl esu jiems labai dėkinga.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. CHOPDE, S., N. PAWAR, V. KELE, and S. CHANGADE. Microencapsulation of probiotic bacteria of available techniques, focusing on biomaterials – a review. *Agricultural reviews*. 2014, 35 (4), 287–294.
2. VIVEK, K. B. Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. 2013, 3 (1), 188–199. ISSN: 2277-209X.
3. SOLANKI, H. K., D. D. PAWAR, D. A. SHAH, V. D. PRAJAPATI, G. K. JANI, A. M. MULLA, and P. M. THAKAR. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *Biomed research international*. 2013, 2013,1–21.
4. RATHORE, S., P. M. DESAI, C. V. LIEW, L. W. CHAN, and P. W. S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*. 2013, 116, 369–381.
5. KILAN, K., P. WARSZYNSKI. Thickness and permeability of multilayers containing alginate cross-linked by calcium ions. *Electrochimica acta*. 2014, 144, 254–262.
6. CHAUHAN, R., V. SINGH, and S. B. CHAUHAN. Microencapsulation of probiotic: techniques & biomaterials. *European journal of pharmaceutical and medical research*. 2015,2 (2), 421–440. ISSN 3294-3211.
7. OZYURT, V. H., S. ÖTLES. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2014, 13 (4), 413–424. ISSN 1889-9594.
8. MALEKI, D., A. AZIZI, E. VAGHEF, S. BALKANI, and A. HOMAYOUNI. Methods of increasing probiotic survival in food and gastrointestinal conditions. *Prensa Med Argent*. 2015, 101 (4), 1–9.
9. PAQUES, J. P., E. V. D. LINDEN, C. J. M. V RIJN, and L. M. C. SAGIS. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*. 2014, 209, 163–171.
10. LIU, S., H. LI, B. TANG, S. BI, and L. LI. Scaling law and microstructure of alginate hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 135, 101–109.
11. GASPERINI, L., J. F. MANO, and R. L. REIS. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J. R. Soc. Interface*. 2014, 11 (100), 19.

12. PATIL, P., D. CHAVANKE, and M. WAGH. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012, 4 (4), 27–32. ISSN 0975-1491.
13. SONG, H., W. YU, M. GAO, X. LIU, and X. MA. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers.* 2013, 96, 181–189.
14. RAKESH, M., C. SOHAN, M. SACHIN, A. PRAVIN, and S. ASHISH. Probiotics: a review on formulation aspects of probiotics. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2014, 29 (2), 251–256. ISSN 0976-044X.
15. DE VOS, P., M. M. FAAS, M. SPASOJEVIC, and J. SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal.* 2010, 20 (4), 292–302.
16. WANG, Y., H. CHEN, J. WANG, and L. XING. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. *Process Biochemistry.* 2014, 49 (10), 1682–1690.
17. ARORA, S., I. P. KAUR, K. CHOPRA, and P. RISHI. Efficiency of double layered microencapsulated probiotic to modulate proinflammatory molecular markers for the management of alcoholic liver disease. *Mediators of Inflammation.* 2014, 1–11.
18. CÓRDOVA AGUILAR, K. C., F. TELLO, A. C. K. BIERHALZ, M. G. G. ROMO, H. E. M. FLORES, and C. R.F. GROSSO. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering.* 2015, 154, 17–24.
19. VOS D. P., H. A. LAZARJANI, D. PONCELET, and M. M. FAAS. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014, 67 (68), 15–34.
20. GARCÍA-CEJA, A., E. MANI-LOPEZ, E. PALOU, and A. LOPEZ-MALO. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT – Food Science and Technology.* 2015, 63 (1), 482–489.
21. CHI-LEUNG HUI, P., W. YI WANG, C.-W. KAN, F. S.-F. NG, C.-E. ZHOU, E. WAT, V. XIN ZHANG, C.-L. CHAN, C. B.-S. LAU, and P.-C. LEUNG. Preparation and



- characterization of chitosan/sodium alginate (CSA) microcapsule containing Cortex Moutan. *Colloids and Surfaces A: Physicochem.* 2013, 434, 95–101.
22. GANDOMI, H., S. ABBASZADEH, A. MISAGHI, S. BOKAIE, and N. NOORI. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT – Food Science and Technology.* 2016, 69, 365–371.
23. ETCHEPARE, D. A. M., J. S. BARIN, A. J. CICHOSKI, E. JACOB-LOPES, R. WAGNER, L. L. MARTINS FRIES, and C. RAGAGNIN DE MENEZES. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural, Santa Maria.* 2015, 45 (7), 1319–1326. ISSN 0103-8478.
24. ZHANG, Y., J. LIN, and Q. ZHONG. S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. *Food Hydrocolloids.* 2016, 52, 804–810.
25. LI, R., Y. ZHANG D. BRENT POLK, P. M. TOMASULA, F. YAN, and L. LIU. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release.* 2016, 230, 79–87.
26. COOK, M. T., G. TZORTZIS, V. V. KHUTORYANSKIY, and D. CHARALAMPOPOULOS. Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *J. Mater. Chem. B.* 2013, 1, 52–60.
27. RAMPINO, A., M. BORGOGNA, B. BELLICH, P. BLASI, F. VIRGILIO, and A. CESÀRO. Chitosan-pectin hybrid nanoparticles prepared by coating and blending techniques. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016, 84, 37–45.
28. ZHANG, Z., R. ZHANG, L. CHEN, and D. J. MCCLEMENTS. Encapsulation of lactase ( $\beta$ -galactosidase) into  $\kappa$ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. *Food Chemistry.* 2016, 200, 69–75.
29. KHOSRAVI ZANJANIA, M. A., B. G. TARZI, A. SHARIFAN, and N. MOHAMMADI. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2013, 13 (3), 843–852.

30. HAFFNER, F. B., R. DIAB, and A. PASC. Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*. 2016, 3(1), 114–136.
31. PHOEM, A. N., S. CHANTHACHUM, and U. P VORAVUTHIKUNCHAI. Preparation of *Eleutherine americana*-alginate complex microcapsules and application in *Bifidobacterium longum*. *Nutrients* 2015, 7 (2), 831–848.
32. TRIPATHI, M.K., S.K. GIRI. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*. 2014, 9 (1), 225–241.
33. CHEOW, WS., K. HADINOTO. Biofilm-like *Lactobacillus rhamnosus* probiotics encapsulated in alginate and carrageenan microcapsules exhibiting enhanced thermotolerance and freeze–drying resistance. *Biomacromolecules*. 2013, 14 (9), 3214–22.
34. MARTÍN, M. J., F. LARA-VILLOSLADA, M. A. RUIZ, and M. E. MORALES. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2015, 27, 15–25.
35. JOHN, R.P., R.D. TYAGI, S.K. BRAR, R.Y. SURAMPALLI, and D. PRÉVOST. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology* . 2011, 31 (3), 211–226.
36. CHANANA, A., M. K. KATARIA, M. SHARMA, and A. BILANDI. Microencapsulation:Advancements in applications.*IRJP*. 2013, 4 (2), 1–5. ISSN 2230–8407.
37. LAKKIS, J. M. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007. ISBN:9780813828558.
38. RAY, S., U. RAYCHAUDHURI, and R. CHAKRABORTY. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*. 2016, 13, 76–83.
39. SERNA-COCK, L., V. VALLEJO-CASTILLO. Probiotic encapsulation. *Global Journal of Medical Microbiology and Reviews*, 2013, 1 (1), p. 84–94.
40. GIBBS, B.F., S. KERMASHA, I. ALI, and C.H. MULLIGAN. Encapsulation in the food industry: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1999, 50 (3), 213–224.

41. F. SHAHIDI, X.Q. HAN. Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1993, 33 (6), 501–547.
42. JANKOWSKI, T., M. ZIELINSKA, and A. WYSAKOWSKA. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol. Tech.* 1997, 11, 31–34.
43. CHÁVARRI, M., I. MARAÑÓN AND M. and C. VILLARÁN. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria, Probiotics [interaktyvus]. InTech, 2012 [žiūrėta 2017-02-05]. Prieiga per: <https://www.intechopen.com/books/probiotics/encapsulation-technology-to-protect-probiotic-bacteria>
44. COOK, M. T., G. TZORTZIS, and D. CHARALAMPOPOULOS. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release.* 2012, 162 (1), 56–67.
45. ZHANG, Y., J. LIN, and Q. ZHONG. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International.* 2015, 71, 9–15.
46. GOGINENI, V. K., L. E. MORROW, P. J. GREGORY, and M. A. MALESKER. Probiotics: History and Evolution. *J Anc Dis Prev Rem.* 2013, 1 (2), 1–7. ISSN: 2329-8731
47. OZEN, M., EC. DINLEYICI. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes.* 2015, 6(2), 159–65.
48. BUTEL, MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect.* 2014, 44 (1), 1–8.
49. HUANG, M.-C. J., and J. TANG. Probiotics in personal care products. *Microbiology Discovery.* 2015, 3, 1–9.
50. KUMAR, S., BB. MAHAJAN, and N. KAMRA. Future perspective of probiotics in dermatology: An old wine in new bottle. *Dermatol Online J.* 2014, 20 (9), 1–9.
51. *The probiotic skincare revolution.* 2017 [žiūrėta 2017-04-11]. Prieiga per internetą: [https://www.clrberlin.com/en/concepts?ul ce=98&st=4&utm\\_source=strongmail&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=TargetedEmailing](https://www.clrberlin.com/en/concepts?ul ce=98&st=4&utm_source=strongmail&utm_medium=email&utm_campaign=TargetedEmailing)
52. L'Oreal, Paris (FR). Methods and compositions for preventing and treating sensitive and dry skin [interaktyvus]. Inventors: Lionel BRETON, Roland JOURDAIN, Audrey GUENICHE, et. al. Int. CI: A61K 33/00, A61K 35/74. US patent, 7651680 B2. 2010 01

26. United States Patent [žiūrēta 2017-02-27]. Prieiga per:  
<https://www.google.ch/patents/US7651680>
53. L'Oreal, Paris (FR). Cosmetic use of microorganism(s) for the treatment of scalp disorders. Inventors: Isabelle CASTIEL, Audrey GUENICHE. Int. CI: A61K 8/02, A61Q 5/12. US patent, 20110014248 A1. 2011 01 20. United States Patent Application Publication [žiūrēta 2017-02-27]. Prieiga per:  
[https://www.google.ch/patents/US20110014248?dq=Us+20110014248+A1&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiUpqDUqpzTAhXC\\_ywKHf-AD7AQ6AEIzAA](https://www.google.ch/patents/US20110014248?dq=Us+20110014248+A1&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiUpqDUqpzTAhXC_ywKHf-AD7AQ6AEIzAA)
54. DIXIT, Y., A. WAGLE, and B. VAKIL. Patents in the Field of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics: A Review. *J Food Microbiol Saf Hyg.* 2016, 1 (2), 1–13.
55. MUIZZUDDIN N., W. MAHER, M. SULLIVAN, S. SCHNITTGER, and T. MAMMONE. Physiological effect of a probiotic on skin. *J Cosmet Sci.* 2012, 63 (6), 385–395.
56. L'Oreal, Paris (FR). Cosmetic use of a lysate of bifidobacterium species for treating body odor. Inventors: Isabelle CASTIEL, Audrey GUENICHE, Dominique BERNARD. Int. CI. A61K 8/99, A61Q 15/00. US patent, WO2011132176 A1. 2011 10 27. United States Patent Application Publication [žiūrēta 2017-02-27]. Prieiga per:  
<https://www.google.ch/patents/WO2011132176A1?cl=en&dq=WO2011132176+A1&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiiq6PrhsJzTAhWFkCwKHSs7D-oQ6AEIJTAA>
57. L'Oreal, Paris (FR). Use of probiotic microorganisms to limit skin irritation. Inventor: Audrey GUENICHE. Int. CI. C12N1/20. US patent, 8481299 B2. 2013 07 09. United States Patent [žiūrēta 2017-02-27]. Prieiga per:  
<https://www.google.ch/patents/US8481299?dq=us+8481299+B2&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiil3Zr5zTAhVKFSwKHUc-AYAQ6AEIITAA>
58. L'Oreal, Paris (FR). Use of probiotic lactic acid bacteria for preventing ultraviolet radiation induced inflammatory or allergic reaction or immunosuppression in the skin. Inventors: Markus BAUR, Lionel BRETON, Francois COUZY, Audrey GUENICHE. Int. CI. A61K 35/74, A61P 37/02. European patent, 1322318 B1. 2010 12 08. European patent specification [žiūrēta 2017-02-27]. Prieiga per:  
<https://www.google.com/patents/EP1322318B1?hl=lt&cl=zh>

59. *Bacillus Ferment*. 2015 [žiūrēta 2017-02-11]. Prieiga per internetą: <http://www.makingcosmetics.com/msds/sds-bacillus-ferment.pdf>
60. DE L., HUH CS, RA J, CHOI ID, JEONG JW, KIM SH, RYU JH, SEO YK, KOH JS, LEE JH, SIM JH, and AHN YT. Clinical Evidence of Effects of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on Skin Aging: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 25 (12), 2160–8.
61. LAN, C-C., C.-C. HSIEH, Y.-S. CHEN, M.-R. SYU, C.-H. HSU, S.-F. LEU, C.-L. HSU, C.-C. HUANG, and C.-C. TSAI. Functional evaluation of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* to anti-allergy and anti-inflammatory in vitro and in vivo. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2016, 11 (2), 49–59. ISSN 1555-1431.
62. VALAN ARASU, M., N. A. AL-DHAB, S. ILAVENIL, K. CHOON CHOI, and S. SRIGOPALRAM. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016, 23 (1), S6–S10.
63. *Responsive alginate hydrogels*. [žiūrēta 2017-05-05] Prieiga per internetą: [http://people.clarkson.edu/~amelman/alginate\\_hydrogels.html](http://people.clarkson.edu/~amelman/alginate_hydrogels.html)
64. CHOONARA, Y. E., V. PILLAY, R. A. KHAN, N. SINGH, and L. C. DU TOIT. Mechanistic evaluation of alginate-hec gelisphere compacts for controlled intrastriatal nicotine release in Parkinson's disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, 98 (6), 2059–2072.
65. KABARA, Jon, J., Donald S. ORTH. *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: Principles and Practices*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1997, ISBN 0824793668.
66. LEE, SANG-YOON, YEON-JI JO, MI-JUNG CHOI, BOO-YONG LEE, JONG-KWON HAN, JAE KAG LIM, and JAE-WOOK OH. Effect of coating method on the survival rate of *L. plantarum* for chicken feed. *Korean J. Food Sci. An.* 2014, 34 (2), 230–237. ISSN 1225-8563.
67. *Formulating with glyceryl stearate (GMS)*. 2015 [žiūrēta 2017-05-05] Prieiga per internetą: <https://knowledge.ulprospector.com/1965/pcc-glyceryl-stearate/>.
68. THIEMANN, A., W. PETERSEN-STRAETMANS. Emulsifier system influences O/W emulsion preservation. *Personal Care*. 2016, 20–62.

69. MUZAMMILA, H. S., B. RASCOB, and S. SABLANI. Effect of inulin and glycerol supplementation on physicochemical properties of probiotic frozen yogurt. *Food & Nutrition Research*. 2017, 61 (1), 1–7.
70. POP, O. L., Z. DIACONEASA, T. BRANDAU, O. CIUZAN, D. PAMFIL, D. C. VODNAR, and C. SOCACIU. Effect of glycerol, as cryoprotectant in the encapsulation and freeze drying of microspheres containing probiotic cells. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*. 2015, 72(1), 27–32. ISSN 2344-2344.
71. SAEGEMAN, V. S. M., N. L. ECTORS, D. LISMONT, B. VERDUYCKT, and J. VERHAEGEN. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns*. 2008, 34, 205–211.
72. SINGH, B. R. Antibacterial activity of glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose and xylose. *Medicine*. 2014, 1–3. ISSN 1941-2681.
73. DAVIDSON, Michael, P., John N. SOFOS, and A. L. BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. USA: CRC press, 2005, ISBN 0824740378
74. ADESHINA, G. O. and J. A. ONAOLAPO. Studies on the efficacy of some preservatives used in packaged orange drinks. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2012, 6 (4), 1513–1518. ISSN 1991-8631.
75. CUEVA, C., M. V. MORENO-ARRIBAS, P. J. MARTIN-ALVAREZ, G. BILLS, M. F. VICENTE, A. BASILIO, C. LOPEZ RIVAS, T. REQUENA, J. M. RODRIGUEZ, and B. BARTOLOME. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*. 2010, 161, 372–382.
76. SHAHMOHAMMADI, M., M. JAVADI, and M. NASSIRI-AS. An overview on the effects of sodium benzoate as a preservative in food products. *Biotech Health Sci*. 2016, 3 (3), 1–5.
77. WRIGHT B., R. A. CAVE, J. P. COOK, V. V. KHUTORYANSKIY, S. M. BO CHEN, M. LEYLAND, and C. J. CONNON. Enhanced viability of corneal epithelial cells for efficient transport/storage using a structurally-modified calcium alginate hydrogel. 2011, 1–31.
78. AYAMA, H., P. SUMPAPAPOL, and S. CHANTHACHUM. Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2014, 36 (3), 291–299.

79. KHOSRAVI ZANJANI, M. A., B. G. TARZI, A. SHARIFAN, and N. MOHAMMADI. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2014, 13 (3), 843–852.
80. LOTFIPOUR, F., S. MIRZAEI, and M. MAGHSOODI. Evaluation of the effect of  $\text{CaCl}_2$  and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2012, 2 (1), 71–78.