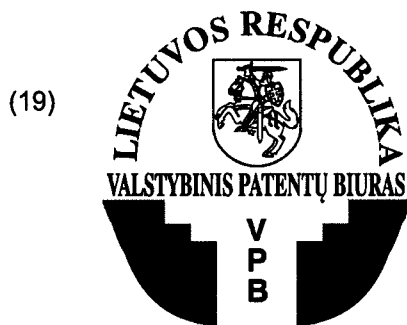




(10) **LT 6463 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6463** (51) Int. Cl. (2016.01): **A61K 8/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2015 103**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2015-12-10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-06-26**
- (45) Patento paskelbimo data: **2017-10-10**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:  
**Juozas ŠIURKUS, LT**  
**Jolanta LIESIENĖ, LT**  
**Aušra ŠIPAILIENĖ, LT**  
**Aistė GRUŽINSKAITĖ, LT**
- (73) Patento savininkas:  
**UAB „Probiosanus“, Ateities g. 10, LT-08303 Vilnius, LT**
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Otilija KLIMAITIENĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:  
**Probiotinių bakterijų (PB) gyvybingumo ir stabilumo padidinimas detergentų turinčiuose asmens higienos ir buities priežiūros produktuose**

- (57) Referatas:

Šis išradimas pateikia būdą išlaikyti ir apsaugoti probiotines bakterijas (PB) nuo paviršiaus aktyviųjų medžiagų, esančių asmens higienos produktuose. Daugeliu atvejų Gram+ PB ir (arba) probiotinių bakterijų metabolitai dedami kaip papildai į detergentų turinčius asmens higienos ir buities priežiūros produktus, siekiant pagerinti produkto funkcines savybes. Mes panaudojome probiotinių bakterijų saugojimo būdą nuo detergentų, kurie turi baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų – katjoninių, amfoterinių ir nejoninių detergentų, fitoekstraktų, terpenų, naudojamų kaip konservantai, ir kvapniųjų medžiagų, bei minėtų medžiagų kompozicijų. PB apsaugos mechanizmas yra pagrįstas bakterijų imobilizacija/inkapsuliacija į polimerus. Mes panaudojome alginato kapsules, kurių polimerinis barjeras suteikia galimybę išlaikyti bakterijų gyvybingumą detergentų turinčiuose asmens higienos arba buities priežiūros produktų kompozicijose. Inkubuojant inkapsuliuotas ir laisvas žinomo titro probiotines *Bacillus coagulans* ląsteles įvairiose detergentų kompozicijose patikrinome ląstelių gyvybingumą.

### Išradimo sritis

Šis išradimas susijęs su nauju probiotinių bakterijų išsaugojimo būdu, kur panaudojamos polimerinės dalelės siekiant apsaugoti bakterijas nuo paviršiaus aktyviųjų medžiagų ir kitų ardančių junginių, kurie paprastai naudojami asmens higienos produktuose, įskaitant jų galutines formules.

### Išradimo apžvalga

Probiotinės bakterijos (PB), tai grupė nepatogeninių mikroorganizmų, kurie yra naudingi žmonių ir gyvūnų sveikatai įvairiais skirtingais būdais. Probiotinis poveikis gali būti susijęs su šiais mechanizmais: (i) baktericidinių medžiagų sekrecija - metabolitų, peptidų ir fermentų gamyba, pH keitimas, bio-konkurencija, (ii) bioplėvelių arba barjerų formavimas ir imunomoduliacija (1 - Walker WA. (2008) Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 46 (Supplement 2): S87-S91 ). Probiotikai gali keisti odos būklę, pavyzdžiui, jie geba efektyviai stabdyti atopinio dermatito vystymąsi (2- Yeşilova, Y., Çalka, Ö., Akdeniz, N., & Berktaş, M. (2012). Effect of Probiotics on the Treatment of Children with Atopic Dermatitis. Annals of Dermatology, 24(2), 189–193.), įskaitant ir kitų odos ligų prevenciją ir odos būklės pagerėjimą (3 - Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. Clinical Microbiology Reviews, 16(4), 658–672.). Kai kurie bakteriniai metabolitai gali veikti kaip antioksidantai ir mažinti arba padėti išvengti melanogenezės ar kitų reaktyviojo deguonies, ar cheminių medžiagų sukeltų odos pažeidimų (4 - Tsao, R., Yang, R. and Young, J.C. (2003) Antioxidant isoflavones in orange, *maclura pomifera* (Raf.) Scheneid. J Agric Food Chem 51, 6445–6451., 5 - Wang, Y.C., Yu, R.C. and Chou, C-C. (2006) Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 23, 128–135). Sveikatai naudingas probiotikų ir/arba jų metabolitų poveikis odai buvo vienas iš veiksnių paskatinusių jų naudojimą asmens higienos ir kosmetikos gaminiuose. Probiotinių bakterijų įterpimo į kosmetikos gaminius tikslas yra sumažinti odos infekcijų, odos riebalų balansavimo ir dermatito padarinius. Vienas iš pavyzdžių yra EP 2306970 A1 patentas, kuriame nurodomas kosmetinės sudėties išradimas susidedantis iš pieno rūgšties ir/arba bifido bakterijų mišinio, kurio procentinė sudėtis yra 0,001-20 % (w/w) kartu su vitaminais (B3, B5, B6, C, D, E, PP), niacinu, karotenoidais, polifenoliais ir mineralais (Zn, Ca,

Mg, Cu, Fe, I, Mn, Se, Cr) bei fitoestrogenais, baltymais, amino rūgštimis, mono- ir polisacharidais, fitoterpenais, fitosteroliais ir gliukozaminais. Šiuose mišiniuose buvo naudojamos *Lactobacillus paracasei* ST1 bakterijos. Patentu paraiškoje taip pat aprašomos probiotikais paremtų kremų, gelių, miltelių ir tablečių sudėtys (6- Patent application EP 2306970 A1).

Patento paraiška FR 2889057 apibrėžia kosmetinės sudėties medžiagą su pienarūgštėmis bakterijomis ir nesočiosiomis riebalų rūgštimis bei jų esteriais (7- Patentu paraiška FR 2889057). Panašiai, patentu paraiška WO 2006/07922 apibrėžia kosmetinės sudėties junginį jautriai odai, kuris paremtas *Lactobacillus paracasei* arba *casei* ir *Bifidobacterium longum* arba *Bifidobacterium lactis* bakterijų naudojimu kartu su kitomis aktyviosiomis medžiagomis (8 - WO 2006/07922). Paraiškos WO 02/28402 ir WO 03/070260 apibrėžia mikroorganizmais paremtus kosmetinės sudėties junginius jautriai odai su raminamosiomis savybėmis ir apsauga nuo odą žalojančio UV poveikio, atitinkamai (9- Patentu paraiška WO 02/28402, 10- Patentu paraiška WO 03/070260).

Nei viename iš šių patentais apsaugotų produktų nepabrėžiama probiotikų ar jų metabolitų stabilumo išsaugojimo, esant tiesioginiam kontaktui su kosmetikos produktuose esančiomis cheminėmis medžiagomis, problema. Probiotinių bakterijų stabilumo įvairiuose mišiniuose problema gali būti susijusi su baktericidinėmis, bakteriostatinėmis ir lizuojančiomis kosmetikos gaminių savybėmis, ypač tų, kurie turi paviršiaus aktyviųjų medžiagų, konservantų, terpenų, alkoholių ir pan. Paviršiaus aktyvios medžiagos (PAM) yra pagrindiniai kosmetikos ir asmens higienos gaminių junginiai, kurie gali būti naudojami valymui, drėkinimui, putojimui arba putojimo stabdymui bei, kaip emulsikliai ar dispersantai. PAM yra vandenyje tirpūs polimerai dėl savo amfofilinių savybių, t.y. jų molekulė sudaryta iš hidrofobinės "uodegos" ir hidrofilinės "galvos". Vandenyje tirpaluose PAM sudaro mices – struktūrinius vienetų, dėl savo hidrofobinės uodegos, kuri atstumia polines grupes, ir hidrofilinės liekanos, kuri nukreipta į tirpinį. Pagal molekulinis parametrus PAM yra skirstomos į anijonines, katijonines ir nepolines (11- Surface-Active Agents: Advances in Research and Application: 2011 Edition. Edited by Ashton Acto). Stipriausias bakterijas lizuojantis poveikis pasireiškia veikiant polinėms PAM, kurių veikimo mechanizmas paremtas sąveika su bakterijų membranų hidrofobinėmis ir hidrofilinėmis dalimis, atitinkamai. Dėl šito poveikio bakterijų sienelių membranos suplyšta ir įvyksta ląstelės lizė bei jos turinio – tirpių baltymų, ribosomų, DNR ir RNR, išsiliejimas į aplinką (12 -

Vasily N. Danilevich, Lada E. Petrovskaya, Eugene V. Grishin (2008) A Highly Efficient Procedure for the Extraction of Soluble Proteins from Bacterial Cells with Mild Chaotropic Solutions. *Chem. Eng. Technol.* 31, 6: 904–910). Bakterijų atsparumas įvairiems fiziniams ir cheminiams veiksniams gali būti padidintas inkapsuliuojant jas į įvairių polimerų kapsules arba įmobilizuojant ant įvairių kietųjų dalelių paviršių (13 - Riaz QU, Masud T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. (2013) *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(3):231-44). Yra keletas technologijų naudojamų bakterijų inkapsuliacijai: purškiamasis džiovinimas, ekstruzija ir emulgavimas. Po to, susidarę dalelės dar gali būti stabilizuojamos jas liofilizuojant. Medžiagos, kurios gali būti naudojamos bakterijų inkapsuliacijai yra polisacharidai, pavyzdžiui alginatas, polisacharidai ir lipidai bei baltymai. Priklausomai nuo inkapsuliavimo metodikos ir medžiagų galima išgauti kelis pagrindinius polimerinių kapsulių tipus: rezervuarus (bakterinės ląstelės yra suspensijoje, kapsulės vidinėje ertmėje), bakterijos įterptos į polimerinę matricą arba padengtos polimerine matrica. Be to, skirtingų polimerų ir inkapsuliavimo metodikų deriniai leidžia išgauti įvairaus dydžio kapsulės nuo 3 µm iki 5 mm. Galiausiai, bakterinių ląstelių paleidimas iš kapsulių, gali būti išgaunamas veikiant temperatūra, keičiant drėgmės kiekį, reguliuojant pH, paveikus fermentais ar mechanine jėga. Dabar egzistuojančių bakterinių preparatų inkapsuliavimo tikslas yra apsaugoti probiotines bakterijas nuo žalingų sąlygų susidarančių žmonių ir gyvūnų virškinimo trakte t.y. labai žemo pH (13 - Riaz QU, Masud T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. (2013) *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(3):231-44).

#### Išradimo santrauka

Probiotinės bakterijos (PB) yra gerai žinoma grupė mikroorganizmų dėl jų naudingo poveikio žmogaus sveikatai. Taigi jos yra plačiai naudojamos, kaip maisto ir kosmetikos bei asmens higienos papildai (K/AHP).

PB teigiamas poveikis kosmetikos gaminiuose gali būti susijęs su žmogaus mikrobiotos papildymu, įvairių antioksidantų gamyba, drėkinimu, biocidinio poveikio junginių gamyba ar kitais fermentacijos produktais, kurie tiesiogiai ar netiesiogiai daro poveikį žmogaus odai ar kitoms organų sistemoms.

Daugeliu atvejų Gram+ ir/arba Gram- PB metabolitais papildomi asmens

higienos ar buities priežiūros produktai siekiant pagerinti produktų plaunamąsias savybes. Tačiau pagrindiniai K/AHP junginiai: paviršiaus aktyviosios medžiagos (detergentai: katijoniniai - natrio laurilsulfatas (SLS), natrio kokoilgliutamatas; amfoteriniai - benzalkonio chloridas, cetrimonio chloridas, kokamidopropilbetainas, kokoamfoacetatas, natrio kokoilglicinatas; ne joniniai - dietanolaminas ir kokogliukozidas), konservantai ir terpenai probiotines bakterijas tiesiogiai veikia kaip biocidai, todėl inkubaciniu produktų laikotarpiu, pvz., produktų saugojimo ir naudojimo metu, probiotinės bakterijos yra inaktyvinamos - nužudomos, dėl ko pakinta produkto sudėtis ir funkcijos. Taipogi, PB metabolitai gali sąveikauti su produkto junginiais, būti paveikti UV spindulių ir/arba oksiduotis, todėl pasikeičia jų cheminė sudėtis arba jie yra inaktyvinami.

Mes panaudojome probiotinių bakterijų saugojimo būdą ir pritaikėme jį PB apsaugojimui nuo asmens higienos arba buities priežiūros produktuose esančių detergentų, kurie pasižymi baktericidiniu poveikiu, t.y. paviršiaus aktyviųjų medžiagų - katijoninių, amfoterinių ir nejoninių detergentų, konservantų, terpenų (kvapų) ir jų mišinių. PB apsaugos mechanizmas remiasi bakterijų imobilizacijos/inkapsuliacijos į polimerines pektino/alginato arba alginato kapsules, kurių polimerinis apvalkalas padeda palaikyti stabilų bakterijų gyvybingumą asmens higienos ar buities priežiūros produktuose.

PB apsaugos mechanizmas remiasi bakterijų imobilizacijos/inkapsuliacijos į polimero, pvz., polisacharido (pektino/alginato arba alginato) ir/arba polisacharidų ir lipidų, ir/arba baltymų, kapsules, kurių polimerinis barjeras leidžia išlaikyti bakterijų gyvybingumą asmens higienos ar buities priežiūros produktuose.

Kaip pavyzdį mes panaudojome *Bacillus coagulans* bakterijas ir jų metabolitus, inkubuodami žinomo titro inkapsuliuotas ir laisvas bakterines ląsteles su įvairiais detergentų mišiniais bei asmens higienos produktais.

Mes eksperimentiškai įrodėme, kad polimerinis inkapsuliavimas stabilizuoja gyvų PB titrus arba sulėtina bakterijų yrimą 120 valandų laikotarpyje esant 37°C temperatūrai, (kas gali būti 120 dienų ekvivalentas esant kambario temperatūrai) inkubuojant bakterijas įvairiose asmens higienos produktų sudėtinėse dalyse. Šiomis eksperimentinėmis sąlygomis mes nustatėme, kad gyvybingų inkapsuliuotų bakterijų išlikimas yra 60-90% geresnis lyginant su analogiškais ne inkapsuliuotomis bakterijomis, kur nuo 60 iki 90% bakterijų buvo inaktyvintos per tą patį laiką, tomis

pačiomis inkubavimo sąlygomis.

#### Trumpas brėžinių aprašymas

Pav. 1. Pateikiami laisvų ir inkapsuliuotų liofilizuotų bei ne liofilizuotų *B. coagulans* bakterijų išgyvenamumo rezultatai po inkubacijos tirpale, kurį sudaro amfoterinė paviršiaus aktyvioji medžiaga - kokamido propil betainas.

Pav. 2. Pateikiami inkapsuliuotų ir laisvų *B. coagulans* bakterijų išgyvenamumo rezultatai po inkubacijos tirpale, kurį sudaro anijoninė paviršiaus aktyviosios medžiaga - natrio laurilsulfatas.

Pav. 3. Pateikiami inkapsuliuotų ir laisvų *B. coagulans* bakterijų išgyvenamumo rezultatai po inkubacijos tirpaluose, kuriuos sudaro – 2% kokogliukozido metiloleatas arba, 3% kokamido dietanolaminas, arba 7% kokogliukozidas.

Pav. 4. Pateikiami inkapsuliuotų ir laisvų *B. coagulans* bakterijų išgyvenamumo rezultatai po inkubacijos tirpale, kurį sudaro greipfrutų sėklų ekstraktas (konservantas) arba d-limonenas (terpenas), arba *Azadirachta indica* ekstraktas.

Pav. 5. Pateikiami inkapsuliuotų ir laisvų *B. coagulans* bakterijų išgyvenamumo rezultatai po inkubacijos tirpale, kurį sudaro nejoninės paviršiaus aktyviosios medžiagos esančios šiuose produktuose: SKYSTAS RANKŲ MUILAS SU PROVITAMINU B5 (UAB Probiosanus) arba NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS ILGAM KAILIUI (UAB Probiosanus), arba NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS TRUMPAM KAILIUI (UAB Probiosanus).

#### Priemonės ir metodai

##### Bakterinių ląstelių paruošimas

Visiems eksperimentams buvo naudojamos probiotinės padermės *Bacillus coagulans* DSM 2311 bakterijos gautos iš DSMZ. Bakterinių ląstelių suspensija paruošta auginant *B. coagulans* ląsteles 100 ml skystos mitybinės terpės (Oxoid) 1000 ml tūrio Erlenmejerio kolbose, 24 valandas esant 37°C temperatūrai bei purtant 180

rpm greičiu. Prieš inkapsuliavimą ląstelės buvo surinktos centrifuguojant jas 6000 rpm greičiu Rotofix 32 A Hettich centrifugoje, vėliau du kartus nuplautos ir patalpintos į sterilų 0,9 % NaCl tirpalą, kuriame ląstelių koncentracija buvo  $10^{11}/\text{ml}$ .

#### Bakterinių ląstelių inkapsuliavimas

*B. coagulans* ląstelių inkapsuliavimas buvo atliekamas naudojant emulsijos formavimo metodą. 200 ml emulsijos, sudarytos iš 40 % vandens fazės ir 60 % saulėgrąžų aliejaus, buvo paruošta ir sumaišyta iki homogeniškos konsistencijos.

Vandens fazė buvo sudaryta iš 2,4 % alginato ir *B. coagulans* bakterijų ląstelių, kur bakterinių ląstelių skaičius -  $10^9$ - $10^{10}$  vienam gramui kapsulių. Aliejinė fazė buvo sudaryta iš 99,5% saulėgrąžų aliejaus su 1 % polisorbato 80. Siekiant išgauti emulsiją, bakterijų-alginato vandens fazė buvo lėtai pilama į aliejaus fazės tirpalą ir maišyta bent 20 minučių kambario temperatūroje. Po to, kai buvo suformuota emulsija, lėtai supiltas sterilus 5,5 %  $\text{CaCl}_2$  tirpalas, kad jo galutinė koncentracija pasiektų 3 %. Tada reakcijos mišinys buvo inkubuojamas kambario temperatūroje keletą valandų. Inkubacijos metu tirpalas buvo apšviečiamas UV šviesa, siekiant sumažinti mikrobinio užterštumo galimybę. Gautos bakterinių ląstelių kapsulės buvo surinktos centrifuguojant žemame slėgyje ir plaunamos du kartus steriliu dejonizuotu vandeniu bei laikomos 0,1 % triptono vandenyje, esant 4 °C temperatūrai. Buvo gautas  $10^{10}$  bakterinis titras 1g kapsulių drėgno svorio.

Pasirinktinai, tolimesniems eksperimentams, kapsulės buvo liofilizuotos 24 val. -110°C temperatūroje Christ ALPHA 2-4 LSC aparate ir laikomos -20°C arba -80°C. Subrendusių kapsulių dydis nustatytas naudojant Malvern Mastersizer 2000 ir svyravo nuo 0.2 mm iki 0.24 mm liofilizuotų (30 minučių po rehidratacijos vandenyje), ir 0.2-0.260mm neliofilizuotų.

#### Inkapsuliuotų bakterijų gyvybingumo analizė detergentų tirpaluose

1 g liofilizuotų ir rehidratuotų ar šviežių mikrokapsulių turinčių  $\sim 10^{10}$  bakterijų buvo įdėtas į pastovaus tūrio (100 ml) tirpalą, t.y. detergentų mišinį, kosmetikos produktų turintį tirpalą arba galutinės formulės detergentų turintį produktą ir inkubuotas 37 °C temperatūroje. Mėginiai buvo paimami tam tikrais laiko momentais norint įvertinti bakterijų išgyvenamumą. Po mėginio paėmimo, bakterinės kapsulės buvo plaunamos du kartus su steriliu vandeniu ir į jas įdedamas pastovaus kiekio sterilus 2 % natrio

citrato tirpalas, kuris padeda išlaisvinti inkapsuliuotas bakterijas. Ląstelių suspensija buvo skiedžiama nuo  $10^1$  iki  $10^5$  kartų ir 100  $\mu$ l tirpalo buvo sėjama ant Petri lėkštelių su kieta mitybine terpe. Inkapsuliuotų ir laisvų bakterijų išgyvenamumas [%] buvo vertinamas lyginant KfV (kolonijas formuojantys vienetai) vidurkius kiekviename laiko momente iš 3 pakartojimų.

Formulės:

$$N \text{ (KfV)} = \left( \frac{KfV * V_{fd}}{V_p} \right) * D$$

N- numanomas KfV;

KfV – suskaičiuotų kolonijų iš kiekvienos įvertintos Petri lėkštelės suma

$V_p$  – lėkštelių tūris

$V_{fd}$ – galutinis praskiedimo tūris

D – praskiedimo kartai

Bakterijų išgyvenamumas [%] =  $N_{(1+n)} / N_1 * 100$

$N_1$  – bakterijų KfV pirmame mėginyje

$N_{(1+n)}$  - bakterijų KfV mėginiuose tam tikrais laiko momentais

Pavyzdžiai

1 pavyzdys.

1 g liofilizuotų ir rehidratuotų ar šviežių mikrokapsulių turinčių  $10^{10}$  bakterijų buvo įdėtas į pastovaus tūrio (100 ml) detergento tirpalą ir inkubuotas 120 valandų  $37^\circ\text{C}$  temperatūroje. Paralelinis eksperimentas buvo atliktas su ne inkapsuliuotomis ląstelėmis (kontrolinė grupė). Po mėginio paėmimo, bakterinės kapsulės buvo

plaunamos du kartus su steriliu vandeniu ir įdėtos į pastovaus kiekio sterilių 2% natrio citrato tirpalą, kuris padeda išlaisvinti inkapsuliuotas bakterijas. Ląstelių suspensija buvo skiedžiama nuo  $10^1$  iki  $10^5$  kartų ir 100  $\mu$ l tirpalo buvo sėjama ant lėkštelių su kieta mitybine terpe. Inkapsuliuotų ir laisvų bakterijų išgyvenamumas [%] buvo vertinamas, kaip aprašyta skyriuje - Inkapsuliuotų bakterijų gyvybingumo analizė detergentų tirpaluose, lyginant KJV vidurkius kiekviename laiko momente iš 3 pakartojimų.

Laisvų ir inkapsuliuotų bakterijų išgyvenamumas tirpale turinčiame amfoterinę paviršiaus aktyviąją medžiagą – kokamido propilbetainą (CAPB) 6,7% (medžiagos pradinė koncentracija – 99 %, BASF).

Eksperimentai parodė, kad 97% laisvų bakterijų (nuo pradinių titrų) buvo inaktyvuotos po 0,5 val. dėl CAPB poveikio, o ~50 % liofilizuotų ir ~35 % neliofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po inkubacijos praėjus 120 val., esant 37 °C temperatūrai (Pav. 1).

Inkapsuliacija efektyviai išsaugojo *B. coagulans* bakterijas amfoterinės paviršiaus aktyviosios medžiagos - kokamido propilbetaino tirpale, nors šis junginys inaktyvavo tos pačios rūšies ne inkapsuliuotas bakterijas.

Laisvų ir liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyvenamumas tirpale turinčiame anijoninę paviršiaus aktyviąją medžiagą – 6,7 % natrio laurilsulfatą (SLS) (medžiagos pradinė koncentracija - 98 %, BASF).

Eksperimentai parodė, kad 80 % laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos dėl SLS poveikio, o ~80 % liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po inkubacijos praėjus 120 val., esant 37 °C temperatūrai (Pav. 2).

Inkapsuliacija efektyviai išsaugojo *B. coagulans* bakterijas SLS tirpale nors šis junginys inaktyvavo tos pačios rūšies ne inkapsuliuotas bakterijas.

Laisvų ir liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyvenamumas tirpaluose turinčiuose nejonines paviršiaus aktyviasias medžiagas: 2 % kokogliukozido metiloleatą (medžiagos pradinė koncentracija - 98 %, BASF), 3 % kokamido dietanolaminą (medžiagos pradinė koncentracija – 98 %, BASF) ir 7 % kokogliukozidą (medžiagos pradinė koncentracija - 98 %, BASF) (Pav. 3).

Eksperimentai parodė, kad 98 % laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos dėl

kokogliukozido metiloleato poveikio po 0,5 val inkubacijos, o ~50% liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po 120 val. inkubacijos (Pav. 3, A dalis); 75 % laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos dėl kokamido dietanolamino (B dalis) ir kokogliukozido (C dalis) poveikio, o >95 % liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po 120 val. inkubacijos, 37 °C temperatūroje (B ir C dalys).

Inkapsuliacija efektyviai išsaugojo *B. coagulans* bakterijas tirpaluose turinčiuose natūralių nejoninių paviršiaus aktyviųjų medžiagų nors šie junginiai inaktyvavo tos pačios rūšies ne inkapsuliuotas bakterijas.

## 2 pavyzdys.

1 g liofilizuotų ir rehidratuotų mikrokapsulių turinčių  $10^{10}$  bakterijų buvo įdėtos į pastovaus tūrio (100 ml) tirpalus: greipfrutų sėklų ekstrakto, d-limoneno arba *Azadirachta indica* ekstrakto, ir inkubuotas 120 valandų 37°C temperatūroje. Paralelinis eksperimentas buvo atliktas su ne inkapsuliuotomis ląstelėmis. Po mėginio paėmimo, bakterinės kapsulės buvo plaunamos du kartus su steriliu vandeniu ir įdėtos į pastovaus kiekio sterilių 2 % natrio citrato tirpalą, kuris padeda išlaisvinti inkapsuliuotas bakterijas. Ląstelių suspensija buvo skiedžiama nuo  $10^1$  iki  $10^5$  kartų ir 100 µl tirpalo buvo sėjama ant lėkštelių su kieta mitybine terpe. Inkapsuliuotų ir laisvų bakterijų išgyvenamumas [%] buvo vertinamas, kaip aprašyta skyriuje - Inkapsuliuotų bakterijų gyvybingumo analizė detergentų tirpaluose, lyginant KfV vidurkius kiekviename laiko momente iš 3 pakartojimų.

Laisvų ir liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyvenamumas tirpaluose turinčiuose: 0,6% konservanto – greipfrutų sėklų ekstrakto ((*Citrus paradisi*) – medžiagos pradinė koncentracija - 98 %, LemonConcentrate) (Pav. 4, A dalis)), 0,7 % terpeno, d-limoneno (medžiagos pradinė koncentracija - 99 %, LemonConcentrate) (B dalis) arba 5% *Azadirachta indica* ekstrakto (medžiagos pradinė koncentracija – 90 %, JSC„Baltkos“) (C dalis).

Eksperimentai parodė, kad 98 % laisvų *B. coagulans* bakterijų buvo inaktyvuotos dėl konservanto - greipfrutų sėklų ekstrakto poveikio po 6 val. inkubacijos, o >50 % liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po 24 val. ir >35 % po 120 val. inkubacijos (A dalis); 100% laisvų *B. coagulans* bakterijų buvo inaktyvuotos po 2

valandų dėl terpenų poveikio (B dalis) ir 75% dėl *Azadirachta indica* ekstrakto poveikio (C dalis), o ~80% liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno po inkubacijos praėjus 6 val. ir 75% po 120 val., 37°C temperatūroje (Pav. 4, B ir C dalys).

Inkapsuliacija efektyviai išsaugojo *B. coagulans* bakterijas tirpaluose turinčiuose natūralių, iš sėklų ekstraktų išgautų konservantų, terpenų ir *Azadirachta indica* ekstrakto, nors šie junginiai inaktyvavo tos pačios rūšies ne inkapsuliuotas bakterijas.

3 pavyzdys.

Šiame eksperimente, kaip detergentų turintys gaminiai buvo naudojami trys komerciniai produktai iš UAB "ProBioSanus": SKYSTAS RANKŲ MUILAS SU PROVITAMINU B5 (sudėtis 1 lentelėje), NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS ILGAM KAILIUI (sudėtis 2 lentelėje) ir NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS TRUMPAM KAILIUI (sudėtis 3 lentelėje).

1 g liofilizuotų ir rehidratuotų mikrokapsulių turinčių  $10^{10}$  bakterijų buvo įdėtas į pastovaus tūrio (100 ml) detergentų turinčius produktų tirpalus, ir inkubuotas 120 valandų 37 °C temperatūroje. Paralelinis eksperimentas buvo atliktas su ne inkapsuliuotomis ląstelėmis. Po mėginio paėmimo, bakterinės kapsulės buvo plaunamos du kartus su steriliu vandeniu ir įdėtos į pastovaus kiekio sterilių 2 % natrio citrato tirpalą, kuris padeda išlaisvinti inkapsuliuotas bakterijas. Ląstelių suspensija buvo skiedžiama nuo  $10^1$  iki  $10^5$  kartų ir 100 µl tirpalo buvo sėjama ant lėkštelių su kieta mitybine terpe. Inkapsuliuotų ir laisvų bakterijų išgyvenamumas [%] buvo vertinamas, kaip aprašyta skyriuje - Inkapsuliuotų bakterijų gyvybingumo analizė detergentų tirpaluose, lyginant KJV vidurkius kiekviename laiko momente iš 3 pakartojimų.

Ne inkapsuliuotų ir alginato mikrokapsulėse (skersmuo - 0,24 mm) inkapsuliuotų liofilizuotų bakterijų išgyvenamumas detergentų turinčiuose komercinių produktų tirpaluose.

Lentelė 1. SKYSTAS RANKŲ MUILAS SU PROVITAMINU B5 (UAB ProBioSanus)

| Junginys                                           | CAS Nb.                             | Masė, [%] |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Natrio laurilsulfatas (SLS koncentracija 70 %)     | 68891-38-3                          | 6,4       |
| Alkil (C8-C10) poliglikozidas (koncentracija 70 %) | 68515-73-1                          | 3,6       |
| (Kokamido DEA, koncentracija 85 %)                 | 68603-42-9                          | 2,8       |
| Glicerolis                                         | 56-81-5                             | 4         |
| Apelsinų terpenai                                  | 5989-27-5                           | 0,35      |
| Kvapai                                             | 233799                              | 0,1       |
| D-pantenolis                                       | -                                   | 0,4       |
| Etilhidroksietil celiuliozė (EHEC)                 | 9004-58-4                           | 0,9       |
| Konservantas (apelsinų terpenai)                   | 26172-55-4<br>2682-20-4<br>100-51-6 | 0,2       |
| Citrinų rūgštis                                    | 5949-29-1                           | 0,015     |

Lentelė 2. NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS ILGAM KAILIUI (UAB ProBioSanus)

| Junginys                                      | CAS Nb.    | Masė, [%] |
|-----------------------------------------------|------------|-----------|
| Natrio kokoilgliutamatas (koncentracija 99 %) | 68187-30-4 | 10        |

|                                                         |                            |      |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|------|
| Kokogliukozidas<br>(koncentracija 99%)                  | 110615-47-9,<br>68515-73-1 | 7,0  |
| Kokobetainas (koncentracija<br>99%)                     | 66455-29-6                 | 5,0  |
| Nimbamedžio ekstraktas<br>( <i>Azadirachta indica</i> ) | 84696-25-3/<br>90063-92-6  | 1    |
| Ramunėlių ( <i>Chamomila<br/>recutita</i> ) ekstraktas  | -                          | 1    |
| Dilgėlių ( <i>Urtica dioica</i> )<br>ekstraktas         | 84012-40-8                 | 1    |
| Ksantano guma                                           | 11138-66-2                 | 0,75 |
| Pieno rūgštis /80                                       | 598-82-3                   | 0,5  |
| Konservantas ACNIBIO C<br>PLUS                          | 90045-43-5                 | 0,06 |

Lentelė 3. NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNAS TRUMPAM KILIUI (UAB ProBioSanus)

| Junginys                                           | CAS Nb.    | Masė,<br>[%] |
|----------------------------------------------------|------------|--------------|
| Kaprilil kaprilgliukozidas<br>(koncentracija 99 %) | 68515-73-1 | 5,38         |
| Natrio kokoilgliutamatas<br>(koncentracija 99 %)   | 68187-30-4 | 4            |
| Kokobetainas (koncentracija 99<br>%)               | 66455-29-6 | 6,7          |
| Gliceril oleatas (ir)                              | 77-92-9,   | 3,85         |

|                                                         |                           |      |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|------|
| kokogliukozidas                                         | 141464-42-8               |      |
| Nimbamedžio ekstraktas<br>( <i>Azadirachta indica</i> ) | 84696-25-3/<br>90063-92-6 | 1    |
| Ramunėlių ( <i>Chamomila recutita</i> ) ekstraktas      | -                         | 1    |
| Dilgėlių ( <i>Urtica dioica</i> ) ekstraktas            | 84012-40-8                | 1    |
| Ksantano guma                                           | 11138-66-2                | 0,75 |
| Konservantas (citrusinių vaisių ekstraktai)             | 90045-43-5                | 0,06 |

Eksperimentai parodė (Pav. 5), kad 80% laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos po 120 val. inkubacijos su SKYSTU RANKŲ MUILU SU PROVITAMINU B5 37 °C temperatūroje, nes jame randami šie baktericidiniai junginiai (i) PAM: natrio laurilsulfatas, alkil (C8-C10) poligliukozidas ir kokamido DEA (ii) terpenai: apelsinų terpenai, kai tuo tarpu >95 % liofilizuotų inkapsuliuotų bakterijų išgyveno tos pačios sudėties tirpale (A dalis); 60 % laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos po 120 val. inkubacijos 37 °C temperatūroje su NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNU ILGAM KAILIUI, kurio sudėtyje yra šių (i) PAM: natrio kokoilgliutamatas, kokogliukozidas, kokobetainas (ii) augalų ekstraktai: nimbamedžio ekstraktas (*Azadirachta indica*), dilgėlių (*Urtica dioica*) ir (iii) konservantas: ACNIBIO C PLUS kuris sudarytas iš askorbo rūgšties (vitaminas C) ir bioflavanoidų iš citrusinių vaisių (vitaminas P) (B dalis); o ~75 % laisvų bakterijų buvo inaktyvuotos po inkubacijos su NAMINIŲ GYVŪNŲ ŠAMPŪNU TRUMPAM KAILIUI (C dalis) kurio sudėtyje yra šių (i) PAM: natrio kokoilgliutamatas, kokogliukozidas, kokobetainas ir gliceriloleatas (ir) kokogliukozidas, (ii) augalų ekstraktai: nimbamedžio ekstraktas (*Azadirachta indica*) ir ramunėlių (*Chamomila recutita*) bei dilgėlių (*Urtica dioica*) ekstraktai, (iii) konservantai: pagaminti iš citrusinių vaisių sėklų ekstraktų. Tuo tarpu, ~>90 % *B. coagulans* bakterijų patalpintų į liofilizuotas mikrokapsules išgyveno po inkubacijos praėjus 120 val. 37 °C

temperatūroje tos pačios sudėties tirpaluose (Pav. 5, B ir C dalys).

Išvados: inkapsuliacija efektyviai išsaugojo *B. coagulans* probiotines bakterijas asmens higienos ir buities priežiūros produktuose turinčiuose anijoninių ir/arba nejoninių, ir/arba amfoterinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų su natūraliais vaisių sėklų ekstraktais, ir konservantais pagamintais iš terpenų ir vitaminų, kai, tuo tarpu, tokios pačios sudėties tirpaluose ne inkapsuliuotos *B. coagulans* bakterijos neišgyveno.

#### Literatūra:

Walker WA. (2008) Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 46 (Supplement 2): S87-S91

Yeşilova, Y., Çalka, Ö., Akdeniz, N., & Berktaş, M. (2012). Effect of Probiotics on the Treatment of Children with Atopic Dermatitis. Annals of Dermatology, 24(2), 189–193.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. Clinical Microbiology Reviews, 16(4), 658–672.

Tsao, R., Yang, R. and Young, J.C. (2003) Antioxidant isoflavones in orange, *maclura pomifera* (Raf.) Scheneid. J Agric Food Chem 51, 6445–6451.

Wang, Y.C., Yu, R.C. and Chou, C-C. (2006) Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 23, 128–135.

Patento paraiška EP 2306970 A1

Patento paraiška FR 2889057

Patento paraiška WO 2006/07922

Patento paraiška WO 02/28402

Patento paraiška WO 03/070260

Surface-Active Agents: Advances in Research and Application: 2011 Edition.  
Edited by Ashton Acton

Vasily N. Danilevich, Lada E. Petrovskaya, Eugene V. Grishin (2008) A Highly Efficient Procedure for the Extraction of Soluble Proteins from Bacterial Cells with Mild

Chaotropic Solutions. Chem. Eng. Technol. 31, 6: 904–910

Riaz QU, Masud T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. (2013) Crit Rev Food Sci Nutr. 53(3):231-44.

Patento paraiška WO2015000972A1

Patento paraiška WO2015019307A1

Patento paraiška US20080107699A1

Patento paraiška WO2004035885A1

WO2013188626A2

US20140065218A1

US9157054B2

WO2010045541A1

US20150071977A1

## Išradimo apibrėžtis

1. Skysta kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, jog ją sudaro:

polimerinės kapsulės su inkapsuliuotomis gyvybingomis Gram+ ir (arba) gyvybingomis Gram- bakterinėmis ląstelėmis, kur minėtos polimerinės kapsulės sudarytos iš polisacharidų ir (arba) polisacharidų ir lipidų, ir (arba) baltymų; ir

bent viena baktericidinė paviršiaus aktyvioji medžiaga arba jų derinys, kur baktericidinės paviršiaus aktyviosios medžiagos yra parinktos iš joninių ir (arba) nejoninių, ir (arba) amfoterinių medžiagų; ir

bent vienas fito-ekstraktas ir (arba) terpenas, ir (arba) alkoholis, ir (arba) riebalų rūgštis, ir (arba) jų metabolitas, ir (arba) organinė rūgštis, ir (arba) vitaminas, ir (arba) baktericidinis/statinis konservantas, ir kvapioji medžiaga, bei tirštiklis.

2. Skysta kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad polimerinių kapsulių dydis svyruoja nuo 0,2 mm iki 5 mm.

3. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-2 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad inkapsuliuotų gyvybingų Gram+ ir (arba) Gram- bakterinių ląstelių skaičius yra nuo 1 iki  $1 \cdot 10^9$  vienoje polimero dalelėje, t.y. nuo 1 iki  $1 \cdot 10^{12}$  gyvų ląstelių kiekviename šlapių kapsulių grame.

4. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-3 punktų, kur tirštiktis yra ksantano guma arba celiuliozė, arba jų mišinys.

5. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog aprašytas polimeras sudarytas iš alginato.

6. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog bent viena iš baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų yra kokogliukozido -

metiloleatas ir (arba) kokamido dietanolaminas ir (arba) kokogliukozidas.

7. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog bent viena iš baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų yra kokamido propilbetainas.

8. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog bent viena iš baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų yra natrio laurilsulfatas.

9. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog aprašytas konservantas yra greipfrutų sėklų ekstraktas ir (arba) terpenas ir (arba) d-limonenas.

10. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-9 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog aprašytos kvapiosios medžiagos yra iš augalų vaisiakūnių, vaisių ar sėklų ekstraktų/aliejų iš *Azadirachta indica*, *Urtica dioica*, *Chamomila recutita*.

11. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5, 8 punktų b e s i s k i r i a n t i tuo jog sudėtyje yra 1g polimerinių kapsulių su inkapsuliuotomis gyvybingomis bakterijų ląstelėmis mišinyje su 100 ml baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų, kurių sudėtis ir santykis nurodytas lentelėje:

| Junginys                             | CAS Nb.    | Masė, [%] |
|--------------------------------------|------------|-----------|
| Natrio laurilsulfatas (SLS 70 %)     | 68891-38-3 | 6,4       |
| Alkil (C8-C10) poliglikozidas (70 %) | 68515-73-1 | 3,6       |
| (Kokamido DEA 85 %)                  | 68603-42-9 | 2,8       |
| Glicerolis                           | 56-81-5    | 4         |
| Apelsinų terpenai                    | 5989-27-5  | 0,35      |
| Kvapai                               | 233799     | 0,1       |
| D-pantenolis                         | -          | 0,4       |

|                                     |                                     |       |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|
| Etil hidroksietil celiuliozė (EHEC) | 9004-58-4                           | 0,9   |
| Konservantas (Apelsinų terpenai)    | 26172-55-4<br>2682-20-4<br>100-51-6 | 0,2   |
| Citrinų rūgštis                     | 5949-29-1                           | 0,015 |

12. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog sudėtyje yra 1g polimerinių kapsulių su inkapsuliuotomis gyvybingomis bakterijų ląstelėmis mišinyje su 100 ml baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų, kurių sudėtis ir santykis nurodytas lentelėje:

| Junginys                                                | CAS Nb.                    | Masė, [%] |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|
| Natrio kokoilgliutamatas                                | 68187-30-4                 | 10        |
| Kokogliukozidas                                         | 110615-47-9,<br>68515-73-1 | 7,0       |
| Kokobetainas                                            | 66455-29-6                 | 5,0       |
| Nimbamedžio ekstraktas<br>( <i>Azadirachta indica</i> ) | 84696-25-3/<br>90063-92-6  | 1         |
| Ramunėlių ekstraktas                                    | -                          | 1         |
| Dilgėlių ekstraktas                                     | 84012-40-8                 | 1         |
| Ksantano guma                                           | 11138-66-2                 | 0,75      |
| Pieno rūgštis/80                                        | 598-82-3                   | 0,5       |
| Konservantas ACNIBIO C PLUS                             | 90045-43-5                 | 0,06      |

13. Skysta kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo jog sudėtyje yra 1g polimerinių kapsulių su inkapsuliuotomis gyvybingomis bakterijų ląstelėmis mišinyje su 100 ml baktericidinių paviršiaus aktyviųjų medžiagų, kurių sudėtis ir santykis nurodytas lentelėje:

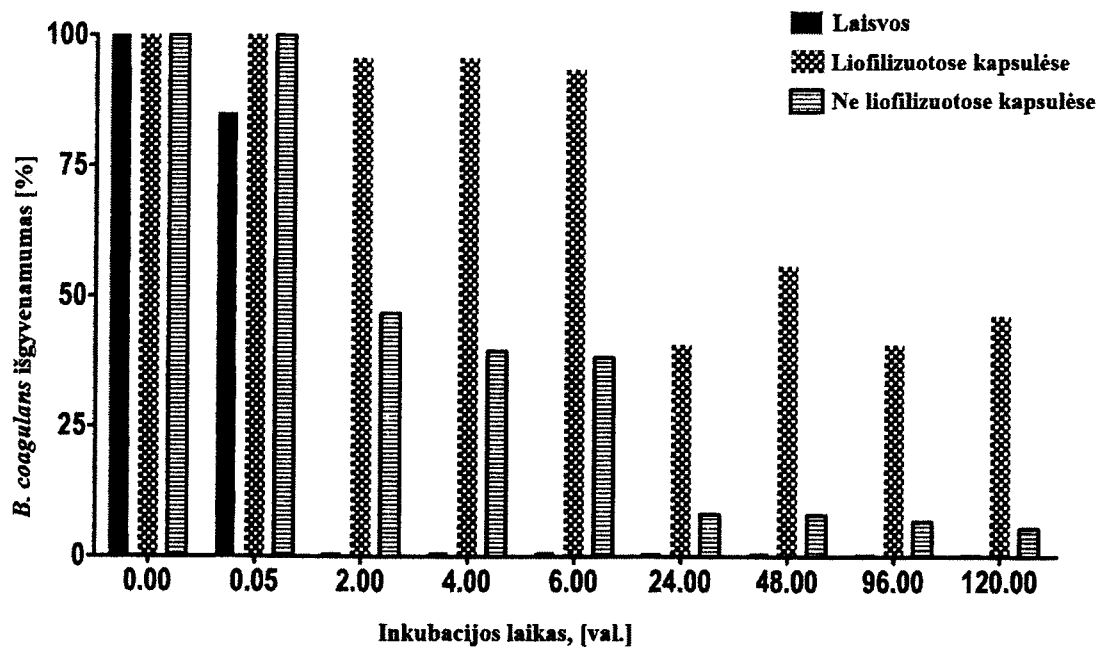
| Junginys                     | CAS Nb.    | Masė, [%] |
|------------------------------|------------|-----------|
| Kaprililas/kaprilgliukozidas | 68515-73-1 | 5,38      |
| Natrio kokoilgliutamatas     | 68187-30-4 | 4         |
| Kokobetainas                 | 66455-29-6 | 6,7       |

|                                                         |                           |      |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|------|
| Gliceriloleatas (ir) kokogliukozidas                    | 77-92-9,<br>141464-42-8   | 3,85 |
| Nimbamedžio ekstraktas<br>( <i>Azadirachta indica</i> ) | 84696-25-3/<br>90063-92-6 | 1    |
| Ramunėlių ekstraktas                                    | -                         | 1    |
| Dilgėlių ekstraktas                                     | 84012-40-8                | 1    |
| Ksantano guma                                           | 11138-66-2                | 0,75 |
| Konservantas (citrusinių vaisių ekstraktai)             | 90045-43-5                | 0,06 |

14. Inkapsuliuotų gyvybingų Gram+ ir (arba) Gram- bakterinių ląstelių naudojimas skystos kompozicijos mišinyje pagal bet kurį iš 1-13 punktų.

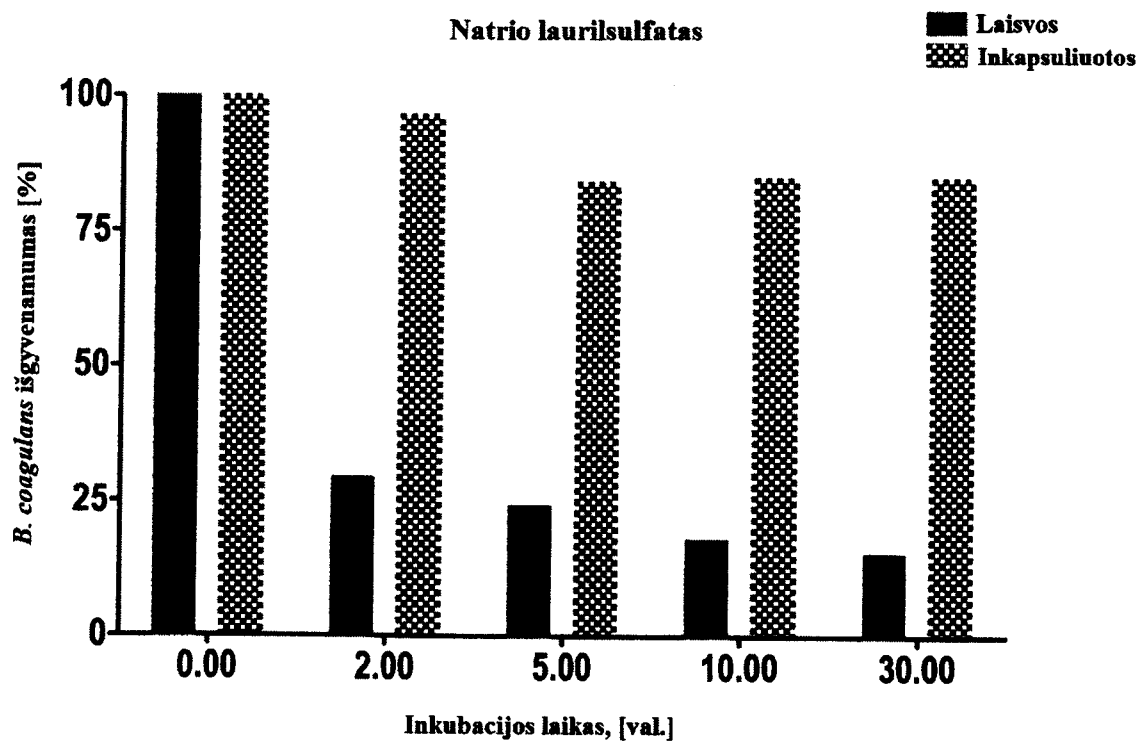
15. Inkapsuliuotų gyvybingų Gram+ ir (arba) Gram- bakterinių ląstelių naudojimas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo jog bakterijos yra *B. coagulans*.

## Kokamido propil betainas (CAPB)

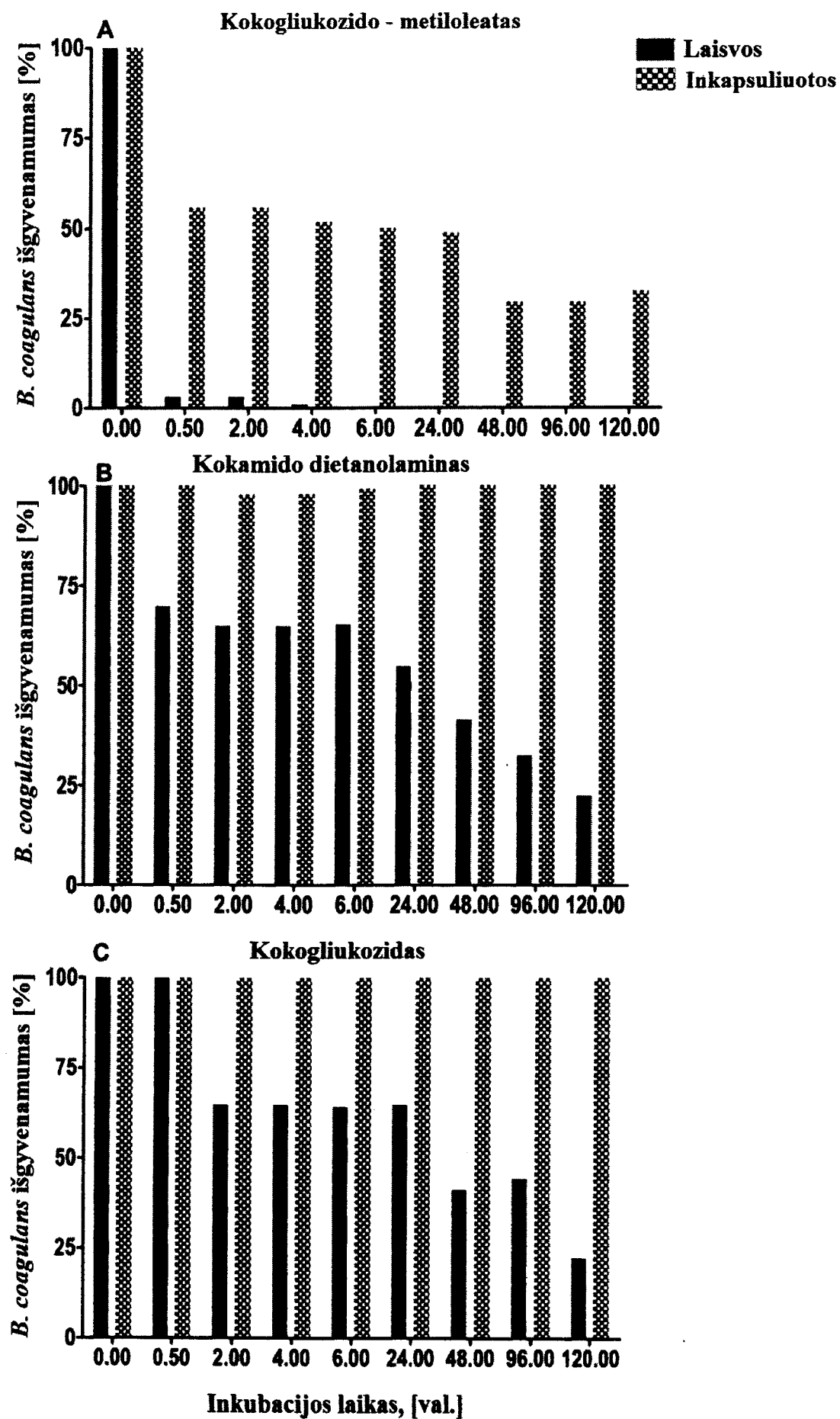


Pav. 1

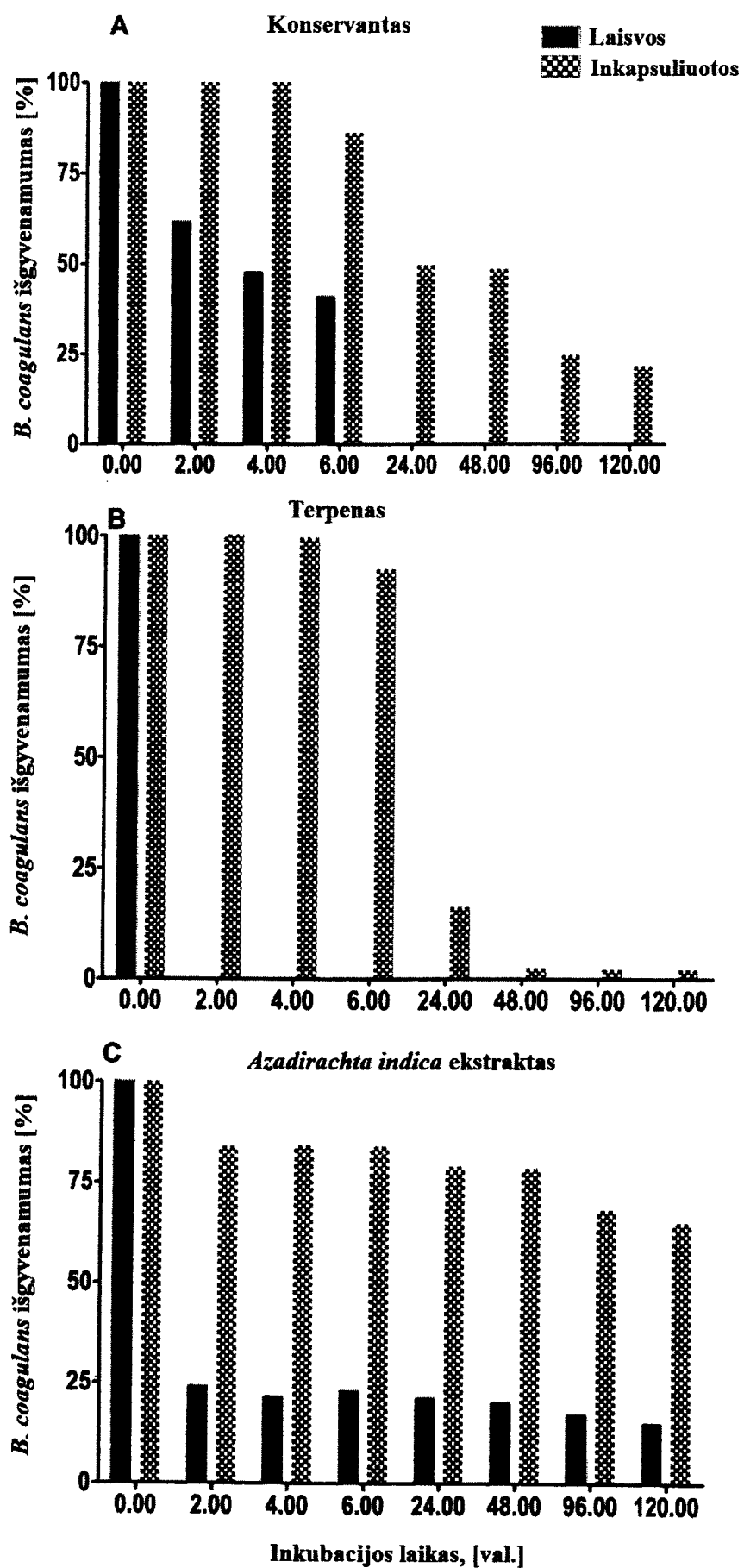
## Natrio laurilsulfatas

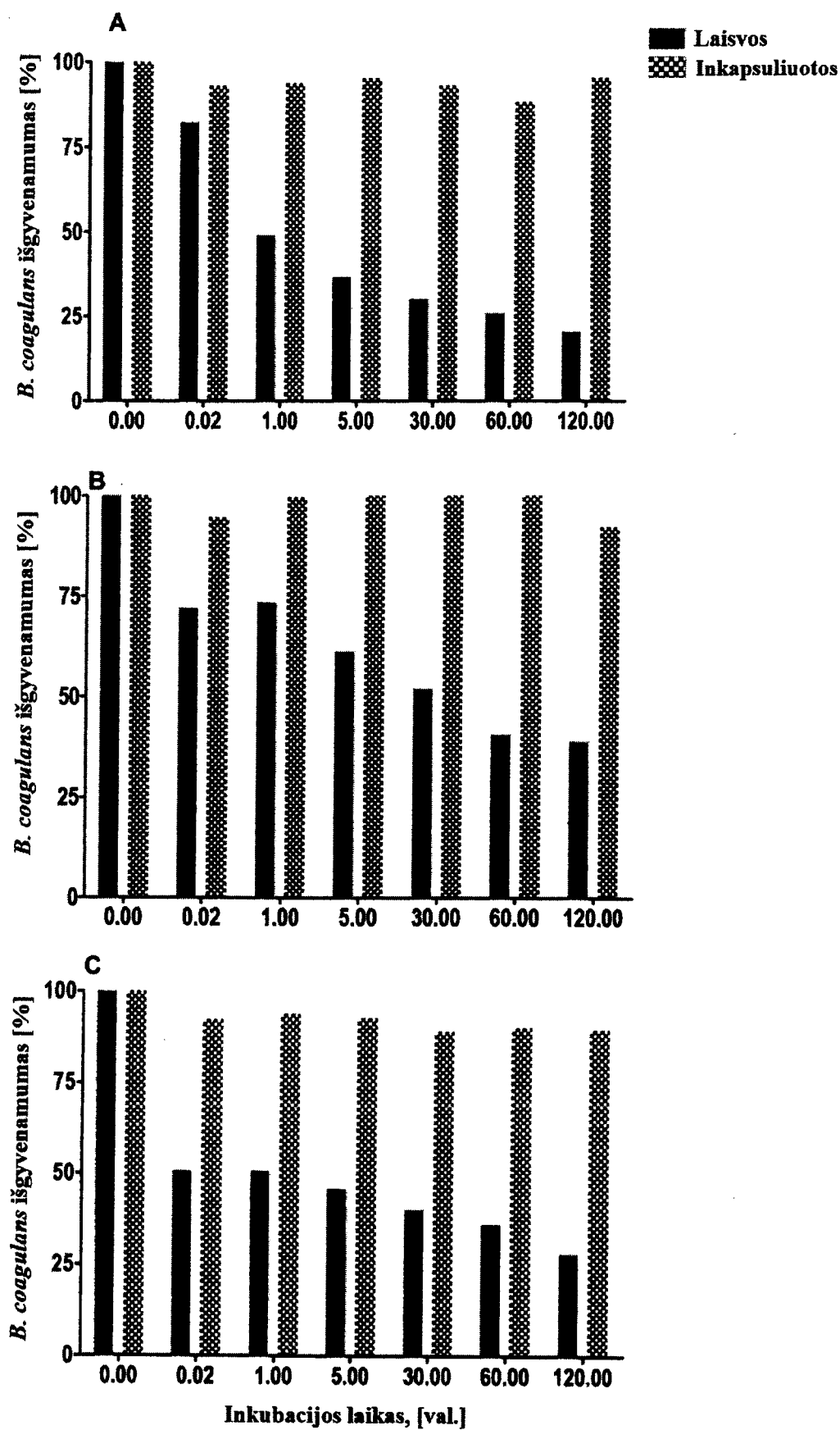


Pav. 2



Pav. 3





Pav. 5