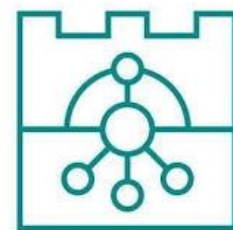




POLITECHNIKA KRAKOWSKA

im. Tadeusza Kościuszki



WYDZIAŁ INŻYNIERII I TECHNOLOGII CHEMICZNEJ

Katedra Chemii i Technologii Organicznej

PRACA DOKTORSKA

Mikrobiom skóry – probiotyki w preparatach kosmetycznych

mgr inż. Anna Maria Łętocha

PROMOTOR:

dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK

KRAKÓW 2025

Składam serdeczne podziękowania
Pani dr hab. inż. Elżbiecie Sikorze, prof. PK oraz
Pani dr hab. inż. Małgorzacie Miastkowskiej, prof. PK
za życzliwą i bezcenną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy

*Niniejszą pracę dedykuję moim wspaniałym Rodzicom
i ukochanemu Piotrusiowi*

Spis treści

Wykaz ważniejszych skrótów i oznaczeń	6
1. Wprowadzenie.....	7
2. Mikrobiom skóry	8
3. Pre- i probiotyki w kosmetykach.....	12
3.1. Substancje prebiotyczne	13
3.2. Substancje probiotyczne.....	14
4. Mikrocząstki polimerowe jako nośniki składników aktywnych	18
4.1. Alginiany - charakterystyka.....	19
4.2. Metody enkapsulacji związków aktywnych w alginianach	20
5. Cel i zakres pracy.....	23
6. Forma pracy doktorskiej oraz wkład doktoranta.....	24
7. Badania opisane w cyklu publikacji [1C – 7C]	28
7.1. Optymalizacja składu nośników	28
7.2. Ocena skuteczności ochrony szczepu probiotycznego przez otoczkę alginianową	30
7.3. Modyfikacja mikrosfer alginianowych	32
8. Ocena wpływu kosmetyku z probiotykiem na mikrobiom skóry	37
8.1. Materiały i metody	37
8.1.1. Materiały	37
8.1.2. Określenie wpływu szczepu <i>L. casei</i> na szczepy <i>S. aureus</i> oraz <i>S. epidermidis</i>	38
8.1.3. Enkapsulacja probiotyków	38
8.1.5. Właściwości fizykochemiczne i żywotność probiotyków w formulacjach...	39
8.1.6. Ocena czystości mikrobiologicznej	40
8.1.7. Badania <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> formulacji z mikrosferami probiotycznymi.....	40
8.2. Wyniki i dyskusja wyników	44
8.2.1. Aktywność szczepu probiotycznego wobec <i>S.epidermidis</i> i <i>S.aureus</i>	44
8.2.2. Właściwości fizykochemiczne i żywotność probiotyków w preparatach miejscowych	45
8.2.3. Ocena czystości mikrobiologicznej	45
8.2.4. Badania <i>in vitro</i> formulacji.....	47
8.2.5. Ocena wpływu formulacji probiotycznej na mikrobiom skóry	55
8.2.6. Badania <i>in vivo</i> potwierdzające skuteczność działania kosmetyków z probiotykiem	57

9.	Podsumowanie przeprowadzonych badań	59
10.	Spis literatury	61
11.	Zestawienie osiągnięć naukowych	71
12.	STRESZCZENIE	77
13.	ABSTRACT.....	80
14.	Kopie publikacji.....	83
15.	Oświadczenia współautorów	203

Wykaz ważniejszych skrótów i oznaczeń

SM – *stratum microbium*

AZS – atopowe zapalenie skóry

FOS – fruktooligosacharydy

GOS – galaktooligosacharydy

ISAPP – Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków (ang. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics)

MP – mikrosfery polimerowe

EE – efektywność enkapsulacji

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa

FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

DoE – planowanie doświadczeń (ang. Design of Experiments)

ATCC – American Type Culture Collection

MRS – De Man-Rogosa-Sharpe

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

PCM – Polska Kolekcja Mikroorganizmów

TSB – Tryptic soy broth

S – Sabouraud broth

BPA – Baird Parker agar

TSA – Tryptic soy agar

CFU – jednostka tworząca kolonię (ang. Colony Forming Unit)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

HaCaT – ludzkie keratynocyty

HSF – ludzkie fibroblasty skóry

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem

FBS – płodowa surowica bydlęca

BSA – albumina surowicy bydlęcej

1. Wprowadzenie

Ludzka skóra jest złożonym ekosystemem, w którym obecne są różnorodne bakterie, grzyby czy wirusy, nazywane ogólnie mikrobiomem skóry, *Stratum microbium* (SM). Przydatki skóry: mieszki włosowe, gruczoły łojowe, gruczoły potowe, a także warstwa rogowa naskórka, są skolonizowane przez unikalną mikroflorę. Po raz pierwszy różnorodność mikrobiomu skóry opisały w 2011 roku Elizabeth Grice i Julia Segre [1]. Obecnie naukowcy zwracają uwagę na istotną rolę, jaką mikrobiom skóry odgrywa w prawidłowym jej funkcjonowaniu: ochronie przed drobnoustrojami chorobotwórczymi, wzmacnianiu układu odpornościowego, czy zdolności do rozkładu i produkcji różnych związków [2–6]. Mikrobiota skóry jest pierwszą linią obrony przed negatywnymi czynnikami środowiskowymi. Przyczynia się do obrony immunologicznej gospodarza, a jednym z mechanizmów jej działania jest hamowanie wzrostu patogenów poprzez produkcję substancji bakteriobójczych. Mikrobiota bierze również udział w rozwoju odporności adaptacyjnej poprzez dostosowanie lokalnej produkcji cytokin i wzmocnienie odporności wrodzonej poprzez zwiększenie produkcji białek przeciwbakteryjnych [7].

Niestety niewłaściwa higiena, mycie i codzienna pielęgnacja skóry mogą zaburzać prawidłowe funkcjonowanie SM, stając się przyczyną nadmiernego wysuszenia skóry, czy zmian chorobowych np. atopowego zapalenia skóry. Dlatego wpływ preparatów kosmetycznych na mikrobiom skóry i konieczność stosowania surowców przyjaznych dla SM, czy uzupełnianie formułacji o surowce z grupy pro- i prebiotyków stało się nie tylko przedmiotem badań naukowych [8,9], ale jednym z wiodących trendów na rynku produktów kosmetycznych.

Temat stał się szczególnie istotny w dobie pandemii *Corona virusa*, gdzie wymóg mycia i dezynfekcji rąk był jednym z elementów reżimu sanitarnego. Stosowanie preparatów higienicznych i dezynfekcja skóry skutecznie ją oczyszczają, usuwając z powierzchni oprócz zanieczyszczeń i mikroorganizmów chorobotwórczych również składniki mikrobiomu skóry [10].

Substancje pro- i prebiotyczne od lat stosowane są z powodzeniem jako składniki suplementów diety. Obowiązujące definicje tych pojęć zostały zasadniczo opracowane dla potrzeb zastosowania jako suplementów diety. Według FAO/WHO probiotyki są “żywymi mikroorganizmami, które podawane w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi” [11]. W kosmetyce terminy te są używane szerzej. Żywe mikroorganizmy mogą być stosowane w produktach kosmetycznych tylko w bardzo ograniczonym zakresie, ponieważ

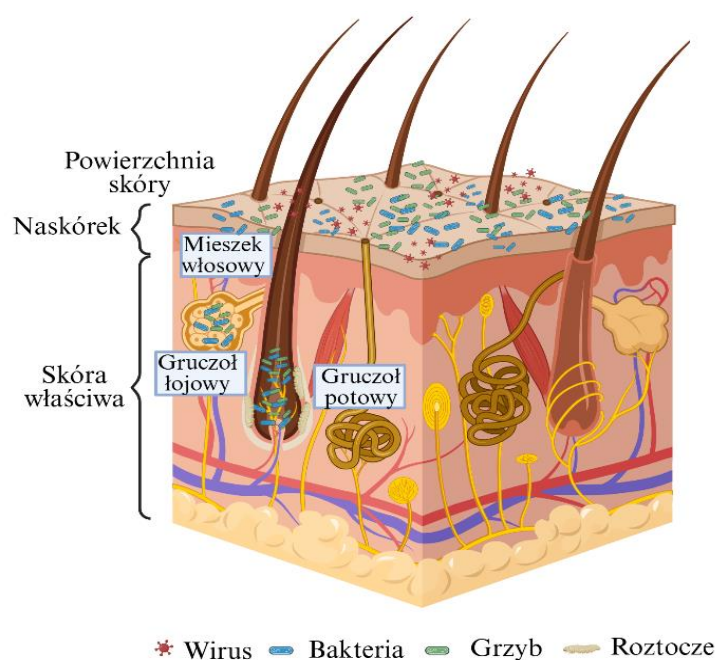
ich żywotność i działanie są trudne do kontrolowania [10,12]. Ograniczenia wynikają również z wymogów dotyczących czystości mikrobiologicznej produktów kosmetycznych [13].

Aby stosować żywe bakterie w preparatach kosmetycznych, należy pominąć środki konserwujące, co z punktu widzenia bezpieczeństwa kosmetyków, wymogów stawianych jakości produktów kosmetycznych (Rozporządzenie nr 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych), jest niemożliwe, zwłaszcza w przypadku produktów zawierających w składzie wodę.

2. Mikrobiom skóry

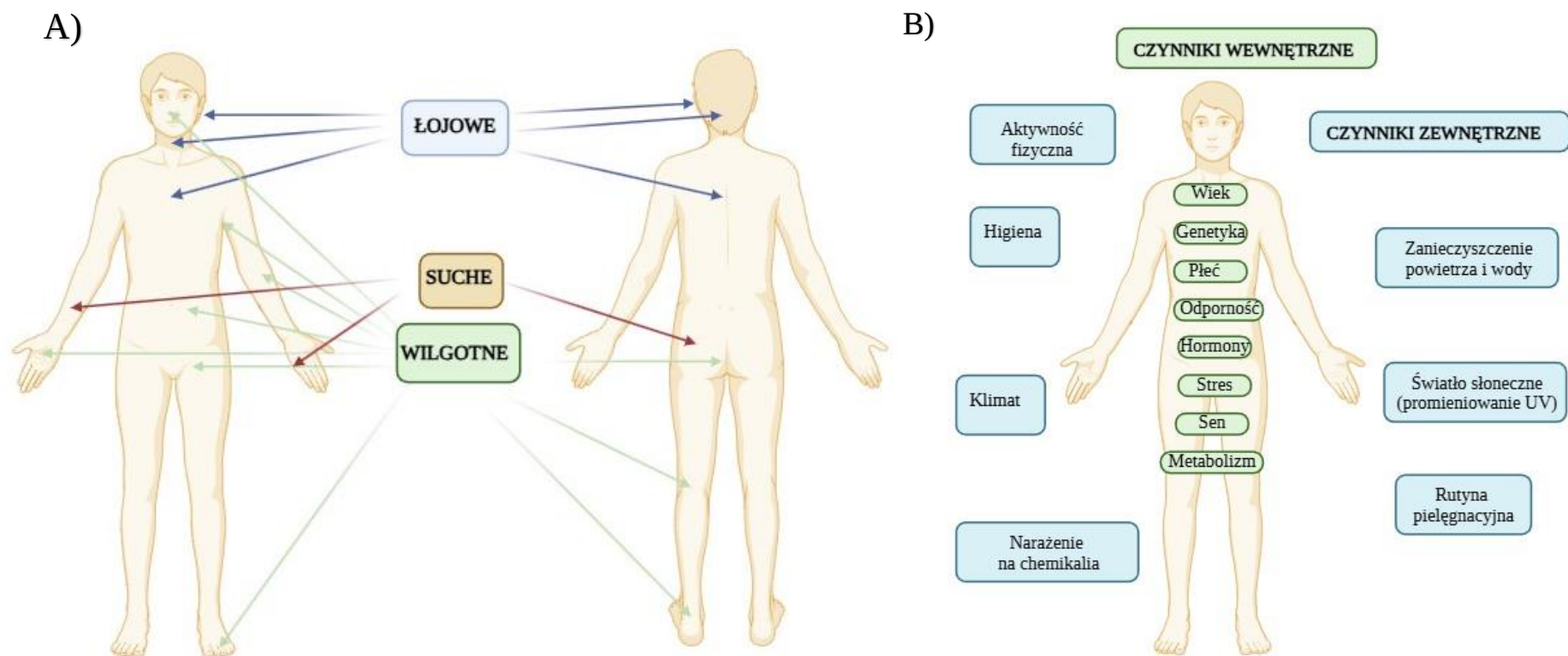
Skóra jest największym organem ludzkiego ciała. Jest to ekosystem o powierzchni około 2 m², a biorąc pod uwagę jej złożoność, (5 milionów przydatków skóry), powierzchnia całkowita znacznie wzrasta do około 25 m², co czyni ją największym organem w ciele [14–16].

Podstawową rolą skóry jest funkcja bariery fizycznej, która chroni organizm przed potencjalnym atakiem obcych osobników lub też toksycznych substancji [1]. Skóra to także interfejs ze środowiskiem zewnętrznym, skolonizowana przez różnorodne grupy mikroorganizmów (bakterie, grzyby, wirusy) oraz roztocza sklasyfikowane w trzech grupach, jako: gatunki osiadłe, czasowe oraz przejściowe [17,18]. Mikroorganizmy oraz roztocza znajdują się na powierzchni skóry, ale również głęboko we włosach, czy też gruczołach, tworząc mikrobiom skóry – *Stratum microbium* (SM) (Rysunek 1) [1].



Rysunek 1. Schemat budowy skóry.

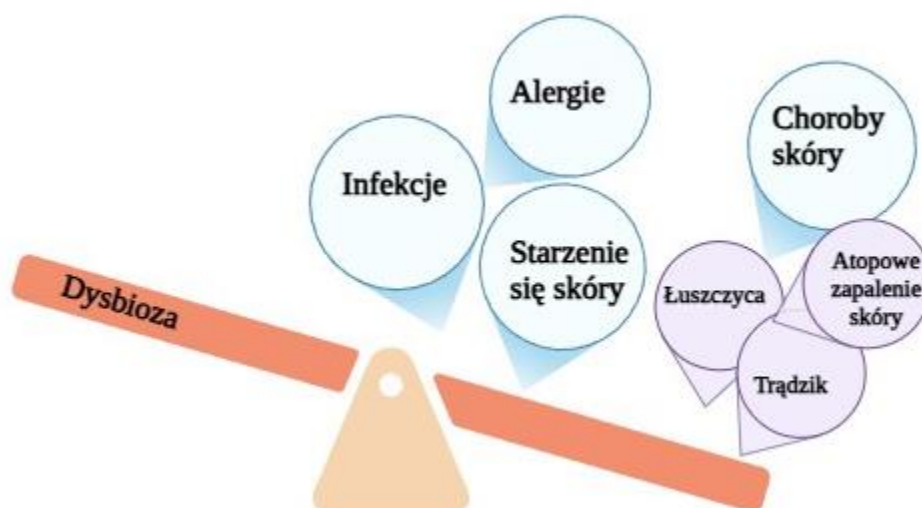
Składniki mikrobiomu skóry są w głównej mierze nieszkodliwe, a w niektórych przypadkach ich obecność zapewnia funkcje życiowe gospodarza, czyli jest wręcz przydatna dla żywiciela. Mikroorganizmy żyjące „w zgodzie” z gospodarzem, czyli mikroorganizmy symbiotyczne i komensalne, zajmują wiele nisz na skórze oraz chronią przed kolonizacją organizmów patogennych oraz szkodliwych substancji [1,19,20]. Do niedawna charakteryzowanie drobnoustrojów zamieszkujących skórę opierało się na technikach hodowli komórkowej. Jednak mniej niż 1% gatunków bakterii ma możliwość wzrostu w warunkach laboratoryjnych, a wiele z nich jest wypieranych przez silniej konkurujące organizmy. W rezultacie nadprezentowane były bakterie i grzyby, do których zalicza się gatunki *Staphylococcus* lub *Malassezia* [21]. Ostatnie postępy dotyczące technologii amplifikacji i sekwencjonowania DNA pozwalają pominąć etapy hodowli komórkowej i zrewolucjonizowały spojrzenie na społeczności mikroorganizmów bytujących na skórze. Wykorzystując metodologię sekwencjonowania DNA można analizować mikrobiom z większą precyzją oraz dokładnością. Analiza ta oparta jest na sekwencjonowaniu genu 16S rybosomalnego RNA (rRNA) i wykazała, iż większość bakterii skórnych zalicza się do jednej z czterech grup: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* oraz *Proteobacteria*. Wyizolowano także drobnoustroje niebakteryjne, do których zalicza się gatunki grzybów - *Malassezia* oraz *Demodex* (roztocze) [1,17]. Podejście molekularne wykazało również, iż kolonizacja bakterii zależy od fizjologii miejsca na ciele człowieka. Na skórze wyróżnia się trzy główne siedliska: wilgotne, łojowe oraz suche, co ma wpływ na charakterystyczną w tych okolicach mikrobiotę (Rysunek 2A) [1,22].



Rysunek 2. A) Rozkład mikrośrodków na ludzkiej skórze, B) Czynniki wewnętrzne i zewnętrzne wpływające na mikrobiom skóry.

Skład gatunkowy, liczebność i rozmieszczenie na powierzchni skóry mogą różnić się też w zależności od czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Oprócz różnic wynikających z uwarunkowań anatomicznych zmienność i obfitość flory bakteryjnej skóry jest zależna od wieku, płci, pory roku, pochodzenia etnicznego, jak również od stresorów takich jak: urazy fizjologiczne i niepokój psychiczny. Czynnikiem przyczyniającymi się do różnorodności mikrobiomu skóry są także czynniki środowiskowe: klimat, wpływ temperatury, promieniowanie UV, ale również styl życia (Rysunek 2B) [19,23].

Skóra jest organem ulegającym ciągłej regeneracji [24,25]. Różnice w składzie warstwy rogowej naskórka mogą powodować dysbiozę, która wpływa na różnorodność gatunków komensalnych oraz ich liczebność [26]. Brak równowagi w mikrobiocie skóry może powodować szereg schorzeń skóry (Rysunek 3) [23].



Rysunek 3. Skutki dysbiozy na skórze człowieka.

Wówczas, gdy funkcja bariery skórnej zostaje zaburzona, może nastąpić zaostrzenie objawów przewlekłych chorób skóry, do których zalicza się atopowe zapalenie skóry [14,15,19,22,23,27–29], łuszczycę [14,15,19,23,28] oraz trądzik [14,15,19,23,28,29]. Kiedy na skórze występuje dysbioza, a różnorodność mikrobiomu zostaje zakłócona, jako modulatory przywracające równowagę mikrobiologiczną mogą zostać wykorzystane substancje z grupy pre- i probiotyków [30].

3. Pre- i probiotyki w kosmetykach

Prebiotyki i probiotyki są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, suplementów diety czy farmaceutycznym, ze względu na przypisywane im korzyści zdrowotne. W przypadku produktów spożywczych i farmaceutycznych probiotyki stosowane są do regulacji mikrobiomu jelit oraz w walce z antybiotykoopornością. Wzrost oporności na antybiotyki i skutki uboczne stały się przyczyną poszukiwania terapii alternatywnych. Oporność na antybiotyki stanowi poważne zagrożenie dla współczesnej medycyny i zdrowia publicznego na świecie. Szacuje się, że globalną śmiertelność związaną z opornością na antybiotyki można przypisać około 1,3 miliona zgonów [31,32], a według przewidywań wzrośnie do 10 milionów zgonów na całym świecie do 2050r. [33]. Ostatnie badania wykazały, że suplementacja probiotykami ma obiecujące perspektywy aplikacyjne. Może przywrócić równowagę mikroflory przewodu pokarmowego i zapobiegać dysbakteriozie wywołanej antybiotykami, pośrednio wpływa hamując na rozwój pałeczek *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [34], bakterii odpowiedzialnych za zapalenie żołądka oraz chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy. Rozpoczęte przez Grice, E. A. i Segre, J. A [1], a obecnie kontynuowane przez grupy badawcze na świecie badania dowodzą, że probiotyki stanowić mogą nie tylko alternatywę w walce z antybiotykoopornością czy chorobą wrzodową żołądka, ale również mogą być pomocne w przypadku leczenia chorób skóry. Stosowanie probiotyków w preparatach miejscowych może stanowić uzupełnienie mikroflory skóry, która została dotknięta stanem zapalnym m.in AZS, skóry suchej lub wrażliwej [30]. Przywrócenie równowagi w SM skóry przełoży się na prawidłowe funkcjonowanie bariery skórnej i redukcję stanów zapalnych związanych m.in z przerwaniem jej integralności i namnażaniem bakterii patogennych.

Wzrost zainteresowania drobnoustrojami kolonizującymi ludzkie ciało, a nie tylko tymi, które je zakażają, doprowadził do wielu badań próbujących regulować skład mikrobiomu i badać wpływ zmiany składu na zdrowie człowieka. Światowy rynek pre- i probiotyków stale rośnie, co częściowo przypisuje się świadomości konsumentów dotyczących korzyści zdrowotnych wynikających z ich spożycia [17,29]. Obejmuje to zastosowania kosmetyczne, gdzie przewiduje się, że rynek probiotyków wzrośnie o 12% w ciągu najbliższych dziesięciu lat, a motorem napędowym będzie Ameryka Północna [35]. Obowiązujące definicje tych pojęć zostały zasadniczo opracowane na podstawie ich stosowania, jako suplementów diety [36].

3.1. Substancje prebiotyczne

Prebiotyki są powszechnie definiowane, jako „niestrawne składniki żywności, które po spożyciu w wystarczających ilościach selektywnie stymulują wzrost i/lub aktywność jednego lub ograniczonej liczby drobnoustrojów w okrężnicy, co daje udokumentowane korzyści zdrowotne” [37,38]. Można je pozyskać z naturalnych źródeł, takich jak bulwy daliai, korzeń cykorii, czosnek, cebula, por, karczoch, szparagi, siemię lniane, soja, a także z mleka krowiego [17]. Prebiotyki znajdujące się w suplementach diety to węglowodany składające się z różnych typów monomerów o krótkim lub długim łańcuchu. Monomery te są połączone za pomocą wiązań, które nie są rozkładane przez ludzkie enzymy trawienne, ale są wykorzystywane przez specyficzne szczepy bakteryjne. Wśród substancji uznawanych za prebiotyki występujących w suplementach diety wymieniane są głównie [39]:

- ✓ fruktany, fruktooligosacharydy (FOS) lub inulina,
- ✓ galaktooligosacharydy (GOS), złożone z monomerów galaktozy,
- ✓ laktuloza, disacharyd złożony z galaktozy i fruktozy.

FOS i GOS obecnie dominują w kategorii prebiotyków, o czym świadczą liczne badania nad ich działaniem prebiotycznym [38]. Nową klasę związków, które mogą również spełniać kryteria prebiotyków stanowią polifenole roślinne. Szacuje się, że 90–95% polifenoli w diecie nie jest wchłaniane w jelicie cienkim, a zatem dociera do okrężnicy, gdzie ulegają rozległej biotransformacji przez mikrobiotę okrężnicy [40]. Coraz więcej dowodów wskazuje, iż korzyści zdrowotne wynikające ze spożycia polifenoli zależą od wykorzystania ich przez mikroorganizmy i wytwarzanych metabolitów, a nie od związków macierzystych [41]. Dowody te rozszerzają koncepcję prebiotyczną poza niestrawne oligosacharydy, takie jak FOS i GOS. Jednak potrzeba więcej badań wskazujących na korzyści zdrowotne, aby wykazać ich status prebiotyczny.

W kosmetykach termin „prebiotyk” jest stosowany w szerszym kontekście, tzn. jako substancje, które mogą zostać wykorzystane przez „dobre” bakterie lub też, jako substancje wytwarzane przez mikroorganizmy (są one również często określane, jako składniki probiotyczne w odniesieniu do kosmetyków). Producenci kosmetyków definiują substancje prebiotyczne następująco: „Prebiotyki są źródłem pożywienia dla pożytecznych drobnoustrojów, aby zapewnić im przewagę konkurencyjną. Dając im pożywienie, rozmnażają się i rozwijają, wykluczając w ten sposób chorobotwórcze (szkodliwe) bakterie” [38].

3.2. Substancje probiotyczne

Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją ustanowioną przez FAO/WHO „probiotyki są żywymi mikroorganizmami, które podawane w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi” [11,37]. Najpowszechniejszymi probiotykami są przedstawiciele rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Natomiast składniki pochodzące z *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Saccharomyces* są stosowane zdecydowanie rzadziej. Należy zauważyć, że probiotyczne są tylko określone szczepy, a nie gatunek [37,39]. Dodatkowo różne szczepy mogą mieć odmienne właściwości probiotyczne, a parametrów jednego szczepu, nie można odnosić w stosunku do innego szczepu, nawet jeśli należą do tego samego gatunku [37]. Na ten fakt należy zwrócić uwagę przy doborze odpowiedniego szczepu do konkretnych zastosowań. W branży kosmetycznej termin „probiotyk” jest używany szerzej. Żywe mikroorganizmy mogą być stosowane w produktach kosmetycznych tylko w bardzo ograniczonym zakresie, ponieważ ich żywotność, czystość i działanie są trudne do kontrolowania [29]. Aby stosować żywe bakterie w preparatach kosmetycznych, należy pominąć środki konserwujące, co z punktu widzenia bezpieczeństwa kosmetyków, wymogów stawianych produktom kosmetycznym (Rozporządzenie nr 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych) jest bardzo trudne. Grupę surowców, łączących korzyści zdrowotne dla skóry mogą stanowić substancje, które nie są bezpośrednio żywymi bakteriami, ale zostały uzyskane za pomocą bakterii probiotycznych. Wśród takich probiotycznych składników kosmetycznych można wyróżnić cztery kategorie [12,39]:

1. Produkty fermentacji – w takim produkcie bakterie probiotyczne rosną w specjalnej pożywce, później są jednak odfiltrowywane, ale roztwór zawiera ich metabolity, takie jak: aminokwasy, witaminy lub substancje przeciwutleniające.
2. Lizaty komórkowe – bakterie nie są odfiltrowywane z pożywki, jednak są unieczynniane, a w takim roztworze można znaleźć składniki ich struktur komórkowych.
3. Surowce po tyndalizacji – bakterie giną na skutek ogrzewania, zanim zostaną one wprowadzone do preparatu. Martwe drobnoustroje nie mają możliwości namnażania się na skórze, a składniki ich komórek oraz metabolity wywierają działanie immunomodulujące hamując rozwój patogenów.
4. Żywe bakterie probiotyczne – do produktu kosmetycznego dodawane są żywe kultury bakterii, jednak w tym wypadku pojawiają się wspomniane wyżej ograniczenia dla stosowania konserwantów, które wpływają negatywnie również na „dobre” bakterie w formulacji. Z tego

względem, większość produktów zawiera w swoim składzie probiotyki w formie martwych komórek mikroorganizmów.

Spośród wyżej wymienionych kategorii największą popularnością cieszy się pierwsza grupa składników probiotycznych [29]. Metabolity bakterii probiotycznych (witaminy, aminokwasy, przeciwutleniacze) otrzymywane w procesie fermentacji stanowią popularny składnik wielu produktów kosmetycznych.

Biorąc pod uwagę najczęściej stosowane w produktach kosmetycznych bakterie, czyli bakterie kwasu mlekowego (*Lactobacillus*) w kosmetykach można znaleźć trzy grupy składników [39]:

- ✓ produkty fermentacji *Lactobacillus* (INCI: Lactobacillus Ferment)
- ✓ filtraty produktów fermentacji *Lactobacillus* (INCI: Lactobacillus Ferment Filtrate)
- ✓ lizaty bakteryjny *Lactobacillus* (INCI: Lactobacillus Lysate).

W 2021r. Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków (ISAPP), w odniesieniu do żywności, zaproponowało również dodatkową definicję – postbiotyków, która oznacza „preparat nieożywionych mikroorganizmów i/lub ich składników, który zapewnia korzyść zdrowotną gospodarzowi” [42]. Porównując te dwa pojęcia, wydaje się, że rozróżnienie między nimi staje się jasne, ponieważ probiotyki są ewidentnie definiowane jako „żywe mikroorganizmy”, a postbiotyki jako „nieożywione mikroorganizmy”. Podążając tym tokiem myślenia, wprowadzenie terminu „postbiotyk” było próbą opisu produktu składającego się z martwych mikroorganizmów, frakcji i lizatów lub metabolitów wydzielanych przez żywe mikroorganizmy lub uwalnianych po lizie komórkowej. Należą do nich enzymy, peptydy, kwasy teichojoyowe, białka powierzchniowe komórek, polisacharydy i kwasy organiczne, które promują korzyści zdrowotne dla gospodarza [43–46]. Jednak mimo tego podziału wprowadzonego w przemyśle spożywczym, w kontekście surowców kosmetycznych termin ten pojawia się bardzo rzadko, a metabolity takie jak lizaty komórkowe, produkty fermentacji czy surowce po tyndylizacji określane są nadal terminem „probiotyk” lub „surowce probiotyczne” [29]. W opublikowanych badaniach można znaleźć szereg różnych terminów odnoszących się do tego typu surowców: surowce probiotyczne, nieżywotne probiotyki, probiotyki zabite ciepłem, czy probiotyki tyndalizowane [36]. Według opisanych w literaturze wyników badań, również takie formy surowców zawierające martwe organizmy, wykazują korzystne efekty biologiczne [47]. Zastosowane jako składniki kosmetyków, pozytywnie wpływają na stan skóry: wykazują działanie nawilżające, łagodzą stany zapalne skóry oraz fotouszkodzenia skóry wywołane promieniowaniem UV oraz poprawiają kondycję, objętej atopowym zapaleniem, skóry [17,25,26,47–53]. W ten sposób substancje probiotyczne

składające się zarówno z żywych, jak i martwych komórek lub metabolitów mikroorganizmów mogą pomóc w zapobieganiu chorobom zapalnym i alergicznym [54]. Badania kliniczne wykazały, iż stosowanie lizatu *Bifidobacterium longum* jest skuteczne w leczeniu wrażliwej i suchej skóry [48,49]. W przypadku badań *ex vivo* ekstraktu z *Bifidobacterium longum* przeprowadzonych przez Guéniche i współautorów [48] stwierdzono statystycznie istotną poprawę w porównaniu z placebo, parametrów związanych ze stanem zapalnym, takich jak zmniejszenie rozszerzenia naczyń, obrzęk i uwalnianie TNF- α . Ponadto, u ochotników, którzy stosowali krem z ekstraktem bakteryjnym zaobserwowano znaczny spadek wrażliwości i suchości skóry po 29 dniach stosowania preparatu.

Kim i współautorzy [47] wykazali, że dwutygodniowe stosowanie *Lactobacillus sakei* probio 65 (zarówno żywych, jak i martwych) istotnie hamowało rozwój zmian skórnych podobnych do atopowego zapalenia skóry (poziomy immunoglobuliny E w surowicy były znacząco obniżone) w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki badań przeprowadzonych przez Jung'a i in. [50] na modelu zrekonstruowanego naskórka Keraskin™ potwierdziły, że lizaty *Lactobacillus rhamnosus* wpływają pozytywnie na funkcję barierową skóry. Zastosowanie lizatu bakteryjnego na Keraskin™ zwiększyło ekspresję białek połączeń ścisłych: kładyny i okładyny oraz białek barierowych skóry, m.in. filagryny. Ponadto cytotoksyczność substancji drażniącej skórę, laurylosiarczanu sodu (SLS), została złagodzona przez wstępne leczenie lizatem, a jego zastosowanie osłabiło również niszczenie desmosomów na skutek działania SLS.

W badaniu przeprowadzonym przez Khmaladze i in. [51] zbadano wpływ szczepu probiotycznego *L. reuteri* DSM 17938 w miejscowych zastosowaniach na skórę, wykorzystując dwa modele: pierwszy – *ex vivo* skupiający się na działaniu przeciwzapalnym i barierowym na skórę oraz drugi – *in vitro* skupiający się na działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Badania wykazały, że zastosowanie zarówno żywych bakterii, jak i lizatu *L. reuteri* DSM 17938 zmniejszyło prozapalne działanie IL-6 i IL-8. Ponadto żywa forma *L. reuteri* DSM 17938 wykazała działanie przeciwbakteryjne przeciwko patogennym mikroorganizmom skóry (*S. aureus*, *S. pyogenes* M1, *C. acnes* AS12 i *P. aeruginosa*), podczas gdy lizat nie wykazał takiej aktywności. Wobec powyższych wyników żywa postać *L. reuteri* DSM 17938 może być stosowana w leczeniu problemów skórnych związanych z fotostarzeniem, przerostem bakterii oraz nawilżeniem skóry. Z kolei lizaty bakteryjne mogą być stosowane w pielęgnacji skóry, gdzie potrzeba działania przeciwzapalnego. W związku z tymi wynikami stosowanie żywych

mikroorganizmów może wydawać się niezwykle obiecujące w kontekście preparatów stosowanych miejscowo na skórę [37].

Rola pro- i prebiotyków jest badana pod kątem ich zdolności do wspierania korzystnej flory bakteryjnej, wzmacniania funkcji bariery skórnej i potencjalnego odwrócenia skutków starzenia. Probiotyki równoważą SM poprzez namnażanie korzystnych bakterii na skórze, poprawiając w ten sposób jej naturalne mechanizmy obronne i integralność bariery, podczas gdy prebiotyki odżywiają te korzystne bakterie, promując zrównoważony mikrobiom, który wspiera ogólne zdrowie skóry [55]. Razem te elementy biotyczne (synbiotyki) mogą stanowić synergistyczne podejście do pielęgnacji skóry, co znajduje potwierdzenie w publikacjach naukowych w odniesieniu do produktów farmaceutycznych [15]. W badaniu Luoto i in. [56] zastosowanie mieszanki probiotyczno – prebiotycznej (*L. rhamnosus* GG ATCC 53103 – GOS) skutkowało niższą częstością występowania infekcji dróg oddechowych u niemowląt w porównaniu z dziećmi otrzymującymi placebo. Z kolei w badaniu Wu i in. [57] synbiotyczna kombinacja *L. salivarius* i FOS wykazała większą skuteczność działania niż sam prebiotyk w leczeniu umiarkowanego do ciężkiego atopowego zapalenia skóry u dzieci.

Pomimo faktu, iż na rynku kosmetycznym coraz więcej kosmetyków zawiera „probiotyki” będące głównie produktami fermentacji probiotycznej istnieje duże zainteresowanie wykorzystaniem żywych bakterii w pielęgnacji skóry suchej i wrażliwej lub leczeniu chorób zapalnych skóry [51,58]. Badanie przeprowadzone przez Peral i in. [59] wykazało, że miejscowe zastosowanie żywego *Lactobacillus plantarum* hamowało stan zapalny i przyspieszyło gojenie ran u pacjentów z przewlekłymi owrzodzeniami żylnych kończyn dolnych. Miejscowe zastosowanie *L. plantarum* na zmiany (25–60 cm²) u 14 pacjentów chorych na cukrzycę i 20 pacjentów bez cukrzycy spowodowało oczyszczenie, utworzenie tkanki ziarninowej i całkowite wygojenie rany po 30 dniach u 43% pacjentów z cukrzycą i u 50% pacjentów bez cukrzycy. Komórki z łożysk owrzodzeń zebrane po leczeniu *L. plantarum* przez 10 dni wykazały zmniejszenie odsetka komórek polimorfonuklearnych, apoptotycznych i martwiczych oraz zmodyfikowanie produkcji IL-8 (wartości IL-8 wzrosły po 5 dniach leczenia, a następnie spadły po 10 dniach), a w efekcie przyspieszyło gojenie się ran.

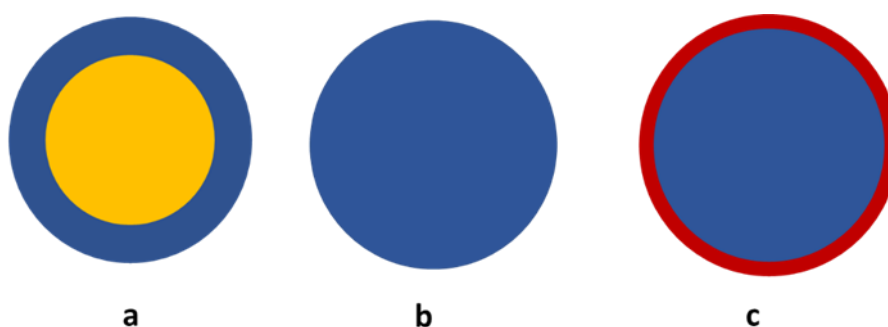
Z dostępnych danych literaturowych wynika, że zastosowanie żywych bakterii w preparatach kosmetycznych wiąże się z dużymi trudnościami. Z jednej strony kontrola namnażania się drobnoustrojów, zachowanie zgodnie z wymogami na odpowiednim poziomie, czystości mikrobiologicznej produktu, z drugiej ochrona probiotycznych mikroorganizmów

przed działaniem zawartych w produkcie środków konserwujących. Na polskim rynku znajduje się jeden produkt w formie preparatu dwufazowego firmy Moliv, w którym w części bezwodnej znajdują się unieczynnione mikroorganizmy (wysuszone rozpyłowo), w drugiej znajduje się właściwa emulsja. A więc bakterie probiotyczne nie mają kontaktu ze środkami konserwującymi, tak jak miałyby to miejsce w przypadku preparatu emulsyjnego zawierającego w swoim składzie wodę.

Metodą pozwalającą na przewyższenie wyżej wymienionych ograniczeń oraz wprowadzenie żywych bakterii do kosmetyku może być mikroenkapsulacja i inkorporacja do formulacji nośnika, wewnątrz którego zamknięte są żywe bakterie probiotyczne. Wybór odpowiedniego materiału powłoki jest kluczowy dla stabilności uzyskanych cząstek i zapewnienia odpowiedniej ochrony mikroorganizmów.

4. Mikrocząstki polimerowe jako nośniki składników aktywnych

„Mikrocząstki” to termin używany dla kulistych cząstek o średnicach rzędu mikrometrów (zwykle od 1 μm do 1000 μm). Polimerowe mikrocząstki są zwykle formowane przez matrycę polimerową, w której można unieruchomić mniejszą ilość związku aktywnego [60]. Biorąc pod uwagę metodę przygotowania, morfologię mikrocząstek i dystrybucję związku aktywnego, można wyróżnić dwie kategorie mikrocząstek: „mikrosfery” i „mikrokapsułki” (Rysunek 4) [60–62].



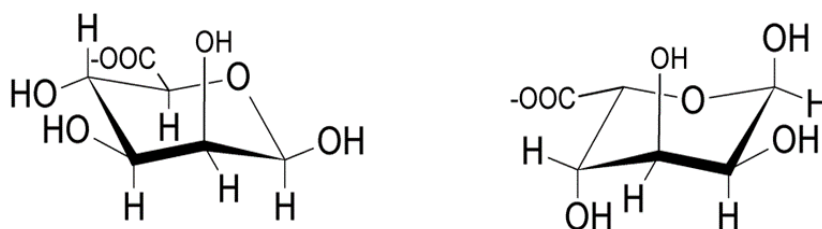
Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie: a) mikrokapsułki, b) mikrosfery, c) powlekaney mikrosfery.

Mikrosfery są zazwyczaj charakteryzowane jako układy matrycowe, w których substancja czynna jest jednorodnie rozproszona. Natomiast mikrokapsułki są cząstkami heterogenicznymi, w których rdzeń (stały lub ciekły) otoczony jest powłoką i tworzy układ z zamkniętym w niej związkiem aktywnym [60,63,64]. W niektórych przypadkach, aby przewyższyć problemy

związane ze stabilnością mechaniczną takich układów, opracowywane są nośniki powlekane dodatkowo substancjami uszczelniającymi ich strukturę [65,66].

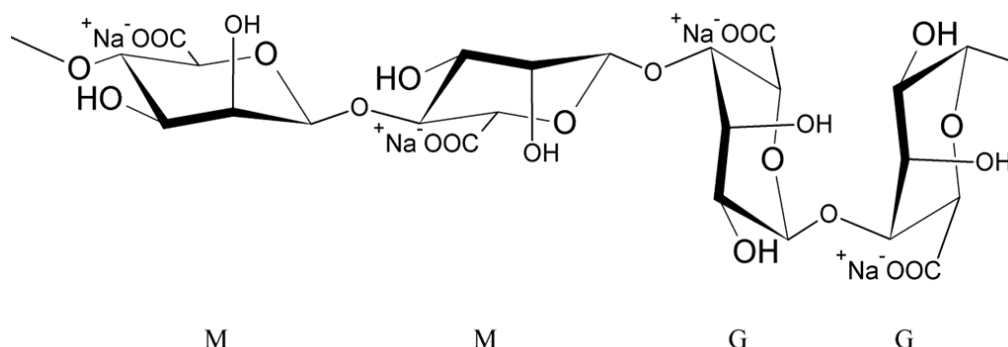
4.1. Alginiany - charakterystyka

Jednym z najczęściej stosowanych biopolimerowych elementów budulcowych do budowy mikrożeli jest alginian – polisacharyd wyizolowany z alg morskich [67,68], zwykle z trzech gatunków brunatnic morskich, Phaeophyceae: *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata* i *Laminaria saccharina*. Alginian jest szeroko stosowany jako nośnik substancji aktywnych ze względu na jego biodegradowalność, biokompatybilność, opłacalność, prostotę i nietoksyczność [69]. Struktura alginianu zależy od źródła glonów morskich, czyli dokładnie od gatunku glonów, pochodzenia geograficznego lub odmian sezonowych [70]. Alginiany to nierozgałęzione kopolimery kwasu D-mannurowego (blok M) i kwasu L-gulonowego (blok G) połączone wiązaniami β (1-4) glikozydowymi (Rysunek 5) [70–76].



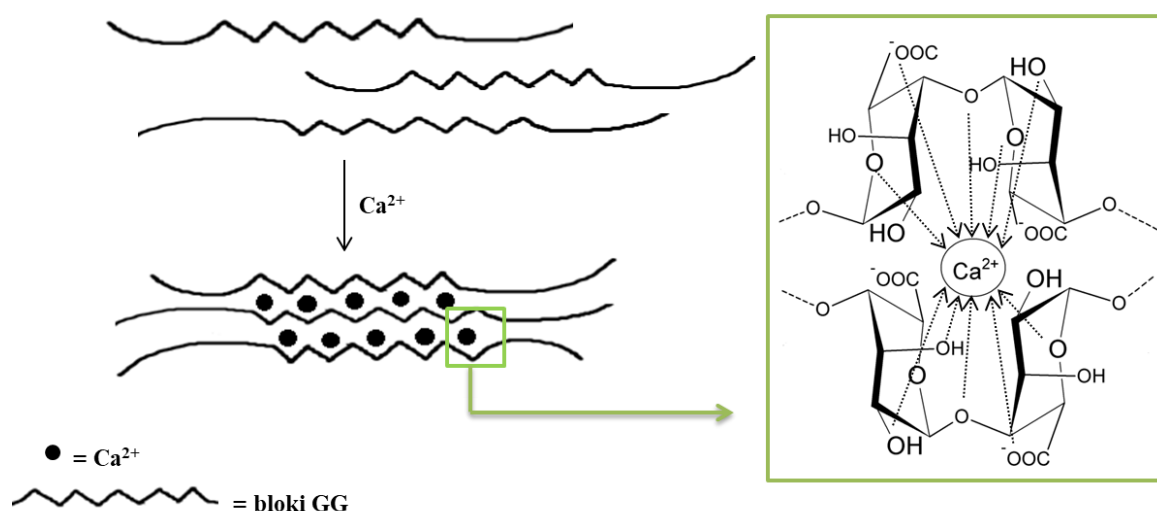
Rysunek 5. Struktura kwasu β -D-mannurowego (blok M) i kwasu α -L-gulonowego (blok G).

Bloki te są ułożone w nieregularny wzór z różnymi proporcjami bloków GG, MM i MG (Rysunek 6) [67,69–71,75]. Elementy M i G są umieszczone w różnych lokalizacjach wzdłuż łańcucha (np. MMMM, GGGG, MMGG, GMGM) i w różnych ilościach [71].



Rysunek 6. Struktura alginianu sodu.

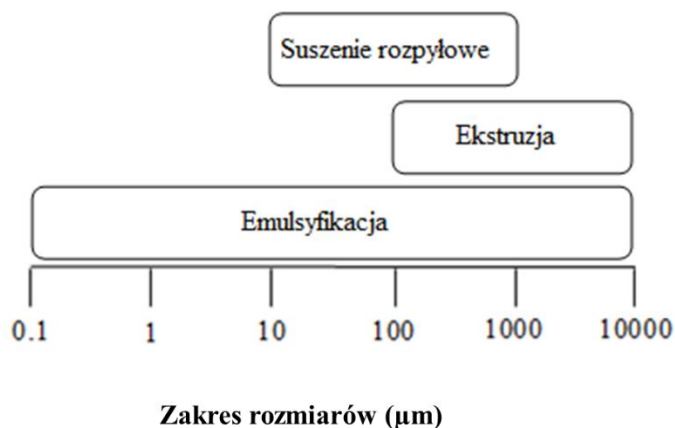
Jednowartościowe jony metali z alginianem tworzą rozpuszczalne sole, natomiast dwuwartościowe i wielowartościowe kationy (z wyjątkiem Mg^{2+}) tworzą żele lub osady. Alginiany zawierające dużą liczbę bloków kwasu guluronowego tworzą żele o znacznie większej stabilności mechanicznej w porównaniu z alginianami bogatymi w mannuroniany, ponieważ bloki G mają silniejsze powinowactwo do jonów dwuwartościowych niż bloki M [67]. Oddziaływanie alginianów z kationami dwuwartościowymi, którymi są w szczególności jony Ca^{2+} , prowadzi do powstania żeli biodegradowalnych. Polimeryzacja polega na sieciowaniu alginianów poprzez wiązania jonowe pomiędzy kationami Ca^{2+} a anionami alginianowymi [71,77]. Wymiana jonów Na^+ na jony Ca^{2+} jest stosunkowo łatwa i zachodzi, gdy wodny roztwór alginianu sodu miesza się z roztworem zawierającym jony wapnia [74]. O właściwościach mechanicznych powstałych żeli decyduje zarówno ilość jonów dwuwartościowych, jak i stężenie soli kwasu alginowego w mieszaninie reakcyjnej, ale tylko wspomniane wyżej bloki G biorą udział w procesie sieciowania [71,77]. Charakterystyczna struktura molekularna wynikająca z tych oddziaływań jest określana jako model „jajko-pudełko” [71,77–79] (Rysunek 7), gdzie bloki homopolimeru G tworzą uporządkowane, trójwymiarowe obszary, w których jony Ca^{2+} są osadzone jak jajka w tekturowym pudełku [80].



Rysunek 7. Sieciowanie alginianów pod wpływem kationów wapnia (model „jajko-pudełko”).

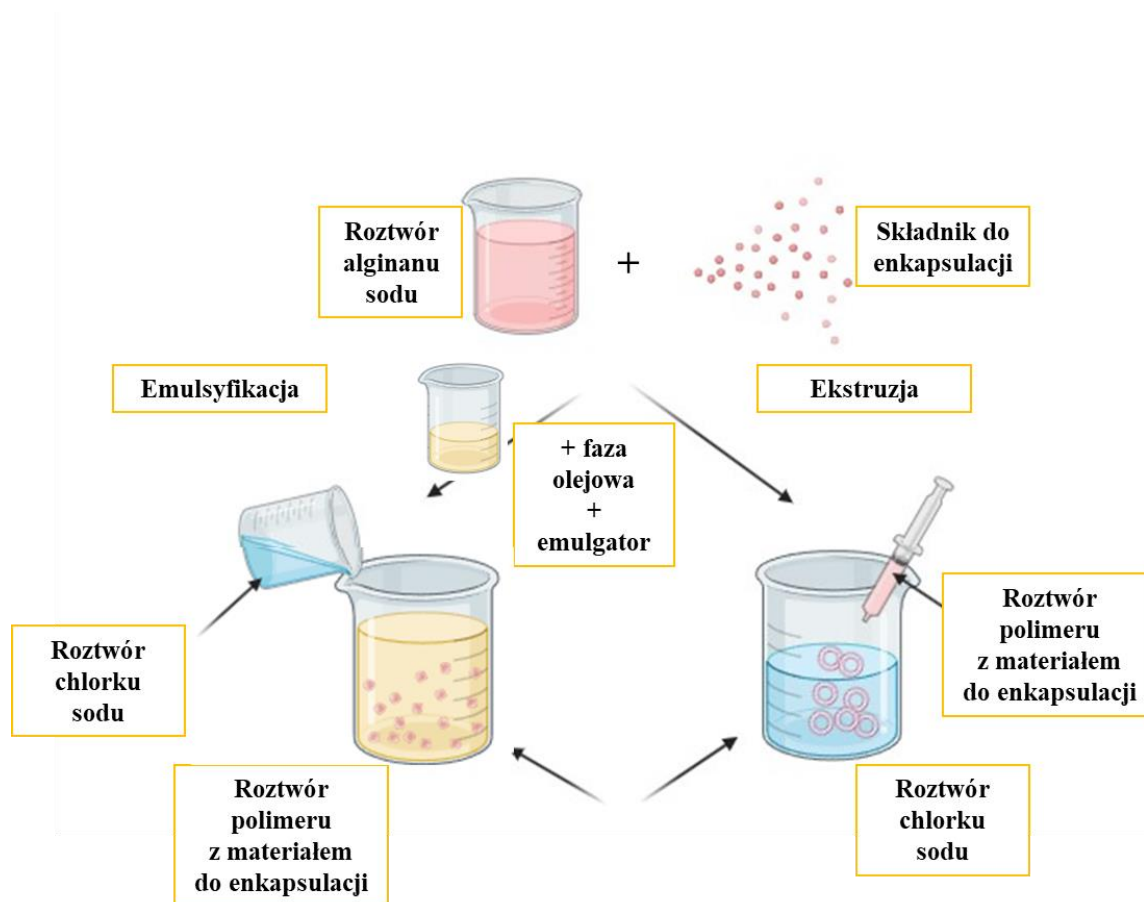
4.2. Metody enkapsulacji związków aktywnych w alginianach

Najczęściej wykorzystywanymi metodami do kapsułkowania związków aktywnych w alginianach są techniki: ekstruzja, emulsyfikacja oraz suszenie rozpyłowe [62]. Na Rysunku 8 przedstawiono typowe rozmiary cząstek uzyskane za pomocą tych metod.



Rysunek 8. Zakres rozmiarów uzyskiwany przez poszczególne techniki enkapsulacji.

Cząstki alginianu otrzymane różnymi metodami mogą mieć rozmiary od makrocząstek do nanocząstek, a największy rozrzut rozmiarów możemy uzyskać w technice emulsyfikacji. Z kolei średnio dużo większe cząstki otrzymujemy w technice ekstruzji. Na Rysunku 9 przedstawiono schemat tworzenia kapsułek za pomocą tych dwóch technik.



Rysunek 9. Schemat procesu enkapsulacji technikami ekstruzji i emulsyfikacji.

Technika ekstruzji jest najstarszą techniką wytwarzania mikrokapsulek [81]. Polega na przygotowaniu roztworu hydrokoloidu (wodna dyspersja nośnika, takiego jak polimer naturalny lub syntetyczny), którym może być alginian sodu. Następnie do roztworu dodaje się materiał do enkapsulacji, a zawiesina jest wkraplana do roztworu sieciującego, którym może być chlorek wapnia [62,69,72,82–87]. W zależności od tego, czy jest to skala laboratoryjna, czy pilotażowa, do wytłaczania stosuje się odpowiednio igłę strzykawki lub ekstruder [72]. Wielkość i kształt otrzymanych kulek zależą od takich czynników, jak średnica igły i odległość igły od roztworu utwardzacza. Ta technika jest najbardziej popularna ze względu na łatwość, prostotę i niski koszt [88].

Z kolei technika emulsyfikacji jest droższa niż metoda ekstruzji ze względu na konieczność stosowania dużej ilości oleju do wytworzenia emulsji. W tej technice faza nieciągła (mieszanina hydrokoloidu i materiału kapsułkowanego) jest dodawana do dużej objętości fazy ciągłej (oleju) [62,69,72,79,82,83]. W zastosowaniach spożywczych jako fazę ciągłą wykorzystuje się oleje roślinne, najczęściej rzepakowy, słonecznikowy, czy kukurydziany [88,89]. Następnie do utworzonej mieszaniny dodaje się emulgator. Powstającą pre-emulsję typu woda w oleju homogenizuje się w sposób ciągły przez mieszanie [62,69,72,82,83]. Szybkość mieszania emulsji jest krytycznym etapem, ponieważ wpływa ona zarówno na kształt, jak i rozmiar utworzonych kapsulek [90]. Bardzo duże kapsułki (o średnicy około 1000 μm lub większej) mogą powodować słabo powleczone struktury oraz grubą teksturę [91], co z kolei wpływa na jakość dyspersji kapsulek w końcowym produkcie [92]. Wytworzoną emulsję destabilizuje się przez dodanie roztworu chlorku wapnia, odwirowuje, oddzielając fazę olejową i wodną w celu otrzymania mikrosfer [93,94].

Szczegółowa charakterystyka nośników alginianowych oraz metod enkapsulacji i ich wad i zalet, czynników wpływających na proces formowania mikrocząstek alginianu oraz ich zastosowań znajduje się w publikacji *“Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications”*, Polymers, 2022; stanowiącej załącznik do niniejszej pracy doktorskiej.

5. Cel i zakres pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie formuacji, zawierającej żywe kultury bakterii probiotycznych, sprzyjających zachowaniu naturalnej flory bakteryjnej skóry. W tym celu konieczne było znalezienie efektywnej formy, nośnika dla probiotyków poprzez dobór naturalnych i biokompatybilnych surowców, optymalnej metody otrzymywania pozwalającej na uzyskanie zarówno wysokiej efektywności enkapsulacji, jak również przeżywalności w czasie szczepu bakteryjnego zamkniętego w nośniku.

Zakres pracy obejmował:

- ✓ Opracowanie nośnika dla żywego szczepu probiotycznego wraz z optymalizacją składu jakościowego i ilościowego formuacji nośnikowej oraz analizą fizykochemiczną nośnika.
- ✓ Badania efektywności enkapsulacji (EE) oraz ocenę żywotności wolnych i kapsułkowanych komórek probiotycznych w zależności od wpływu pH, środka konserwującego, temperatury, UV.
- ✓ Opracowanie formuacji bazowej, w postaci emulsyjnej, w której jako składnik probiotyczny zastosowano mikrosfery alginianowe zawierające bakterie kwasu mlekowego wraz z doбором układu konserwującego.
- ✓ Opracowanie alternatywnej formuacji bazowej dla mikrosfer alginianowych, pozwalającej na pominięcie środków konserwujących.
- ✓ Modyfikację mikrosfer alginianowych o dodatek składnika prebiotycznego w celu uzyskania większej żywotności komórek bakterii wraz z optymalizacją składu jakościowego i ilościowego nośnika.
- ✓ Powlekanie zmodyfikowanych mikrosfer za pomocą biopolimerów w celu uzyskania maksymalnego stopnia hermetyczności nośnika oraz ocenę przeżywalności szczepu probiotycznego w powlekanych mikrosferach.
- ✓ Ocenę efektywności działania formuacji z mikrosferami probiotycznymi (MP) – ocenę cytotoksyczności (test MTT) i badania wpływu na proliferację komórek (test MTT).
- ✓ Badania *in vitro* i *in vivo* wpływu formuacji kosmetycznej zawierającej MP na mikrobiom skóry, potwierdzające kolonizację skóry probantów szczepem probiotycznym obecnym w kosmetyku.

W celu pełniej charakterystyki fizykochemicznej opracowanych mikrosfer alginianowych z probiotykami zastosowano szereg metod badawczych, między innymi skaningową mikroskopię elektronową, transmisyjną mikroskopię elektronową, mikroskopię optyczną, badania reologiczne, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera, spektroskopię Ramana. Ponadto zastosowano metody oceniające właściwości mikrobiologiczne nośników i formulacji (metoda pour plate, metoda studzienkowo-dyfuzyjna).

Prezentowana praca doktorska wpisuje się w aktualną tematykę badań nad mikrobiomem skóry, ma duże znaczenie dla rozwoju technologii otrzymywania nie tylko innowacyjnych preparatów kosmetycznych, ale także farmaceutycznych, czy też agrochemicznych.

6. Forma pracy doktorskiej oraz wkład doktoranta

Przedstawiona rozprawa doktorska pt. „Mikrobiom skóry – probiotyki w preparatach kosmetycznych” jest wynikiem kilkuletnich badań. Opis przeprowadzonych badań został zebrany w formie dwóch oddzielnych części. W rozdziale 7 omówiono metodykę i wyniki badań opublikowane w cyklu 5 publikacji [1C – 5C], patencie [6C] i zgłoszeniu patentowym [7C]. Opisane w publikacjach wyniki badań dotyczą optymalizacji parametrów otrzymywania nośników alginianowych oraz badania właściwości fizykochemicznych i efektywności enkapsulacji probiotyków [2C], oceny żywotności bakterii i MP pod wpływem różnych czynników zewnętrznych oraz opracowania emulsji O/W zawierającej probiotyki [3C], opracowaniu formulacji oleożelowej zawierającej kapsułki probiotyczne [4C], a także modyfikacji mikrosfer alginianowych poprzez dodatek prebiotyku oraz powlekanie struktur, w celu uzyskania maksymalnego stopnia hermetyczności [5C].

Przedstawiony cykl obejmuje artykuły naukowe, opublikowane w recenzowanych czasopismach, ujętych w bazie Journal Citation Indicator (JCI), o sumarycznym indeksie wpływu IF = 20,4 (punktacja MNiSW = 640 pkt.). W rozdziale 8 omówiono metodykę prowadzenia i wyniki badań dotyczących oceny wpływu opracowanych formulacji, zawierających MP, na mikrobiom skóry. Opisane badania są przedmiotem kolejnego artykułu naukowego, który został wysłany do publikacji w czasopiśmie Scientific Reports.

Cykl publikacji:

[1C]. **Łętocha A.***, Miastkowska M., Sikora E., Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications, *Polymers*, 2022, 14, 3834

Udział: Anna Łętocha – 60%, Małgorzata Miastkowska – 20%, Elżbieta Sikora – 20%

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 93

IF: 4,7

MNiSW: 100 pkt.

SJR: Q1

Mój udział polegał na dokonaniu krytycznego przeglądu literaturowego dotyczącego technik enkapsulacji alginianów, zalet i wad różnych metod enkapsulacji, czynników wpływających na proces formowania mikrocząstek alginianu, zastosowań mikrocząstek alginianu oraz przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma a także współudziale w redagowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

[2C]. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier, *Chemical and Process Engineering: New Frontiers*, 2023, 44(3), e20

Udział: Anna Łętocha – 60%, Alicja Michalczyk – 20%, Małgorzata Miastkowska – 10%, Elżbieta Sikora – 10%

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 3

IF: 0,5

MNiSW: 100 pkt.

SJR: Q4

Mój udział polegał na zaplanowaniu badań statystyczną metodą planowania eksperymentu (DoE), opracowaniu formułacji nośnikowej, przeprowadzeniu optymalizacji procesu otrzymywania mikrosfer alginianowych, określeniu optymalnego składu i parametrów otrzymywania oraz właściwości fizykochemicznych nośnika, enkapsulacji bakterii probiotycznych w nośniku, określeniu właściwości fizykochemicznych, przygotowaniu układów do badania efektywności enkapsulacji i żywotności zakapsulkowanych probiotyków w czasie, opracowaniu wyników oraz

przygotowaniu pierwotnej wersji tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma a także współudziale w redagowaniu odpowiedzi dla recenzentów..

[3C]. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Ostrowska P., Miastkowska M., Sikora E., Probiotics-Loaded Microspheres for Cosmetic Applications, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183

Udział: Anna Łętocha – 65%, Alicja Michalczyk – 20%, Paulina Ostrowska – 1%, Małgorzata Miastkowska – 9%, Elżbieta Sikora – 5%

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 5

IF: 2,5

MNiSW: 100 pkt.

SJR: Q2

Mój udział polegał na zaplanowaniu badań, enkapsulacji probiotyków w mikrosferach alginianowych, przygotowaniu formułacji dla mikrosfer alginianowych zawierających probiotyki wraz z doborem układu konserwującego, określeniu właściwości fizykochemicznych otrzymanych formułacji, przygotowaniu mikrosfer probiotycznych i formułacji do badań żywotności komórek bakteryjnych w czasie, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem czasopisma.

[4C]. **Łętocha A.***, Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, Molecules, 2024, 29, 5984

Udział: Anna Łętocha – 55%, Małgorzata Miastkowska - 10%, Elżbieta Sikora - 10%, Alicja Michalczyk – 10%, Marta Liszka- Skoczylas – 10%, Mariusz Witczak – 5%

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 1

IF: 4,2

MNiSW: 140 pkt.

SJR: Q1

Mój udział polegał na zaplanowaniu badań, otrzymaniu nośników alginianowych techniką emulsyfikacji i ekstruzji, ocenie właściwości fizykochemicznych nośników, przygotowaniu formułacji oleożelowej wraz z kapsułkami probiotycznymi, przygotowaniu układów do badań właściwości lepkosprężystych oraz badań żywotności komórek bakteryjnych w czasie, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem czasopisma.

[5C]. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., Effect of Encapsulation of Lactobacillus casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria, ACS Applied Materials&Interfaces, 2024, 16(39), 52878-52893

Udział: Anna Łętocha – 70%, Alicja Michalczyk – 15%, Małgorzata Miastkowska – 8%, Elżbieta Sikora – 7%

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 4

IF: 8,5

MNiSW: 200 pkt.

SJR: Q1

Mój udział polegał na zaplanowaniu badań, dobraniu źródła prebiotyku i ocenie wpływu mąki z tapioki na wzrost szczepu probiotycznego, enkapsulacji probiotyków w nośnikach, przeprowadzeniu optymalizacji procesu otrzymywania mikrosfer alginianowo – tapiokowych, ocenie właściwości fizykochemicznych otrzymanych mikrosfer, opracowaniu powlekanych mikrosfer i ocenie efektywności powlekania za pomocą spektroskopii Ramana, określeniu stopnia przeżywalności probiotyków w opracowanych układach w czasie, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem czasopisma.

[6C] Patent PL 246674, Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., Sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne, 2025

Udział: Anna Łętocha – 33,4%, Małgorzata Miastkowska – 33,3%, Elżbieta Sikora – 33,3%

[7C] Zgłoszenie patentowe P. 445990, Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., Formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne, 2023.

Udział: Anna Łętocha – 25%, Małgorzata Miastkowska – 25%, Elżbieta Sikora – 25%, Alicja Michalczyk – 25%

7. Badania opisane w cyklu publikacji [1C – 7C]

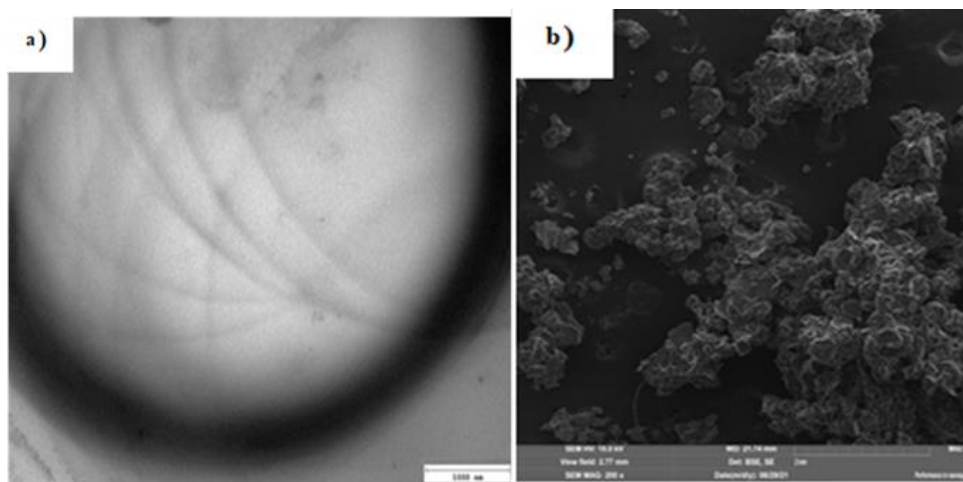
Pierwszy etap badań dotyczył opracowania efektywnej formy, nośnika dla żywych szczepów probiotycznych. Przed przystąpieniem do pracy badawczej przeprowadzono analizę literatury dotyczącej potencjalnego materiału i formy nośnika do enkapsulacji bakterii probiotycznych. Na tej podstawie, jako surowiec do otrzymania nośników został wytypowany polimer naturalnego pochodzenia – alginian sodu, materiał stosowany w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Natomiast dotychczas kapsułki alginianowe – w szczególności mikrosfery pełniące rolę nośników mikroorganizmów – nie były stosowane w przemyśle kosmetycznym. Powodem są ograniczenia dotyczące składu kosmetyków, zwłaszcza konieczność stosowania konserwantów, które eliminując bakterie patogenne, jednocześnie niszczyłyby również pożądane, żywe kultury bakterii, w tym szczepy probiotyczne. W oparciu o przeprowadzoną analizę literatury przygotowano pracę przeglądową [1C]. W publikacji omówiono techniki enkapsulacji alginianów oraz zalety i wady każdej z metod. Ponadto, przedstawiono czynniki mające istotny wpływ na proces formowania mikrocząstek alginianu oraz ich dotychczasowe zastosowania.

Alginiany należą do naturalnych, hydrokoloidów pozyskiwanych z alg morskich. W wyniku ich oddziaływania z kationami dwuwartościowymi, którymi są w szczególności jony Ca^{2+} , następuje proces sieciowania jonowego i powstanie mikrosfer, mikrokapsulek lub mikrożeli. Charakterystyczną strukturę molekularną wynikającą z tych oddziaływań określa się jako model „jajko-pudełko”. Z analizy literaturowej i patentowej wynika, że najczęściej stosowanymi technikami do enkapsulacji składników aktywnych w alginianach są: suszenie rozpyłowe, ekstruzja czy emulsyfikacja. Każda z metod ma swoje wady i zalety [1C]. Jednak ze względu na różny rozmiar cząstek otrzymanych tymi metodami w badaniach zastosowano metodę emulsyfikacji, pozwalającą na otrzymanie kapsulek o najmniejszych i jednorodnych rozmiarach. Zbyt duży rozmiar kapsulek może negatywnie wpływać na teksturę i właściwości sensoryczne preparatów kosmetycznych. Z kolei zbyt mały rozmiar (skala nano) byłby nieodpowiedni dla enkapsulacji probiotyków, gdyż wielkość komórek bakteryjnych zwykle mieści się w przedziale od 1 do 4 μm [1C].

7.1. Optymalizacja składu nośników

Kolejnym etapem badań było opracowanie technologii wytwarzania nośników alginianowych [2C]. Proces otrzymywania mikrosfer alginianowych zoptymalizowano z wykorzystaniem matematycznych metod planowania eksperymentu (DoE). W pierwszej kolejności określono parametry wejściowe, czyli zmienne mające wpływ na parametry

wyjściowe – końcowy rozmiar otrzymywanych nośników. Sporządzono dwa plany frakcyjne (z zastosowaniem procesu homogenizacji ultradźwiękowej i z użyciem homogenizatora mechanicznego typu „rotor-stator”) z jednym punktem w centrum planu. Sprawdzono, czy parametry wejściowe w istotny sposób wpływają na parametry wyjściowe. Do grupy parametrów wejściowych zaliczono w obu przypadkach stężenie i szybkość wkraplania środka sieciującego oraz amplitudę ultradźwięków (w przypadku metody ultrasonifikacji) lub szybkość obrotów rotora (w przypadku homogenizacji mechanicznej). Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA). Za pomocą testu F dokonano oceny istotności różnic. We wszystkich przypadkach za istotną statystycznie uznano wartość $p < 0,05$. Zostały opracowane profile funkcji użyteczności uwzględniające parametry niezależne. W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskano profile aproksymacji, które pozwoliły określić optymalne parametry procesu. Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano stabilne mikrosfery alginianowe o rozmiarach od 10 do 30 mikrometrów. Otrzymane w wyniku optymalizacji nośniki alginianowe poddano badaniom właściwości fizykochemicznych. Kształt i rozmiar kapsułek analizowano za pomocą mikroskopu optycznego. Natomiast morfologię otrzymanych mikrosfer badano stosując skaningową i transmisyjną mikroskopię elektronową (SEM i TEM) (Rysunek 10).



Rysunek 10. a) Zdjęcie TEM powłoki alginianowej, b) Zdjęcie SEM struktury mikrosfer.

Otrzymane wyniki wykazały, że zastosowane w celu zmniejszenia rozmiarów oraz uzyskania stabilnych i jednorodnych mikrosfer metody homogenizacji (ultrasonifikacja i homogenizacja mechaniczna) dają podobne rezultaty. W dalszych badaniach zastosowano ultrasonifikację (ze względu na krótszy czas procesu i nieco mniejsze średnie rozmiary mikrosfer $\approx 5 \mu\text{m}$).

Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji [2C] w dalszych badaniach w celu uzyskania mikrosfer alginianowych (zarówno pustych jak i zawierających probiotyki (szczep *Lactobacillus casei* ATCC 393)) zastosowano parametry procesu zamieszczone w Tabeli 1.

Tabela 1. Optymalne parametry otrzymywania mikrosfer alginianowych.

Parametry procesu	Optymalne wartości parametrów
Stężenie chlorku wapnia (środka sieciującego)	0,3 mol/dm ³
Szybkość wkraplania CaCl ₂	10 kropli na minutę
Amplituda procesu ultrasonifikacji	69%

Sposób otrzymywania mikrosfer probiotycznych (MP) został objęty patentem o numerze PL 246674 [6C]. Przeprowadzono również badania mające na celu sprawdzenie efektywności enkapsulacji (EE). Wyniki otrzymanych badań wykazały, że zastosowana metodyka pozwoliła uzyskać wysoką EE bakterii (72-94%) w zależności od formy (sposobu wydzielenia mikrosfer z dyspersji i prędkości wirowania) [2C].

7.2. Ocena skuteczności ochrony szczepu probiotycznego przez otoczkę alginianową

W celu oceny żywotności bakterii pod wpływem różnych czynników zewnętrznych, zawiesinę szczepu probiotycznego oraz zawierające ją mikrosfery poddano działaniu różnych czynników fizykochemicznych takich jak: temperatura, promieniowanie UV, odczyn pH oraz działanie środka konserwującego. Oceny żywotności komórek probiotycznych wolnych i zakapsułkowanych dokonano poprzez zliczanie kolonii bakteryjnych wyrosłych na płytkach z agarowym podłożem De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) po użyciu techniki inokulacji „pour plate” [3C]. Następnie mikrosfery wykazujące najwyższą odporność na ww. czynniki zostały wykorzystane jako składnik aktywny formułacji kosmetycznych, dla których starannie dobrano system konserwujący. Spośród testowanych konserwantów, w najmniejszym stopniu na żywotność szczepu *L. casei* ATCC 393 zamkniętego w mikrosferach miał układ na bazie benzoesanu sodu w połączeniu z solami sodowymi kwasu lewulinowego i anyżowego. W porównaniu z początkową gęstością szczepu w mikrosferach (9,60 log CFU/g), żywotność *L. casei* zmniejszyła się o 0,26 log bezpośrednio po otrzymaniu formułacji kosmetycznej, o 3,42 log po 7 dniach i o 3,54 log po miesiącu przechowywania. Dlatego też układ ten zastosowano jako system konserwujący dla emulsji O/W w celu zapewnienia żywotności mikroorganizmów i stabilności mikrobiologicznej produktów. Formułacja ta – E2 (Tabela 2) objęta jest zgłoszeniem patentowym o numerze P. 445990 [7C].

Tabela 2. Skład formułacji bazowej (E1) i zawierającej MP (E2).

Skład emulsji	Nazwa INCI składnika	Skład procentowy [% mas.]	
		E1	E2
Faza wodna	Water		
	Xanthan gum		
	Sodium levulinate; sodium anisate	78	77
	Sodium benzoate		
Faza olejowa	Avocado oil	15	15
Emulgatory	Sorbitan stearate; sucrose cocoate		
	Glyceryl stearate; polyglyceryl-6 palmitate/		
	succinate; cetearyl alcohol	7	7
Substancje aktywne	Microspheres with probiotics	-	1

Uzyskane wyniki wykazały znaczącą poprawę przeżywalności mikrokapsułkowanego szczepu probiotycznego w formułacjach kosmetycznych mimo obecności w składzie emulsji środków konserwujących (6,13 log CFU/g po 120 dniach przechowywania) w porównaniu z formacją zawierającą niekapsułkowany szczep probiotyczny, w przypadku którego zaobserwowano całkowitą redukcję komórek bakteryjnych [3C].

Poszukując różnych form fizykochemicznych kosmetyków z bakteriami probiotycznymi, równolegle, opracowano stabilne formułacje oleożelowe, do których wprowadzono mikrokapsułki alginianowe zawierające bakterie probiotyczne [4C]. Oleożele (organożele) to układy powstające w wyniku żelowania rozpuszczalników organicznych (oleju lub niepolarniej cieczy) za pomocą organożelatora [4C]. Ze względu na brak zawartości wody w takich preparatach, układy te nie muszą zawierać konserwantów, a więc stanowią alternatywę dla zaproponowanej wcześniej emulsji O/W. W wyniku badań opracowano dwa oleożele, w pierwszym żelatorem była krzemionka Aerosil 200 (INCI: Silica), a w drugim Sucragel (INCI: Glycerin, Aqua, Sucrose Laurate), do których włączono liofilizowane nośniki alginianu z probiotykiem, *L. casei* ATCC 393. Do wytworzenia kapsułek z probiotykami zastosowano dwie techniki — ekstruzję i emulsyfikację. Kulki alginianu uzyskane w procesie ekstruzji miały rozmiar około 1,2 mm, podczas gdy znacznie mniejsze mikrosfery (o rozmiarach od 8 do 17 μm) uzyskano przy użyciu techniki emulsyfikacji. Jako środek kriochronny, w celu poprawy wskaźnika przeżywalności probiotyków w liofilizowanych nośnikach alginianowych została dodana trehaloza. Wydajność enkapsulacji i przeżywalność bakterii w czasie określono za pomocą wcześniej wymienionej techniki inokulacji „pour plate”. Dla obu zastosowanych

metod – emulsyfikacji i ekstruzji, efektywność enkapsulacji była wysoka i wynosiła odpowiednio 90% i 87% [5C]. Uzyskane wyniki wykazały, że metoda produkcji mikrosfer zawierających probiotyki wpływa na żywotność bakterii. Lepszą przeżywalność mikroorganizmów w opracowanych układach uzyskano w przypadku mikrosfer wytworzonych metodą emulsyfikacji (mniejsza redukcja żywotności komórek bakteryjnych – Tabela 3).

Tabela 3. Przeżywalność bakterii probiotycznych w opracowanych układach.

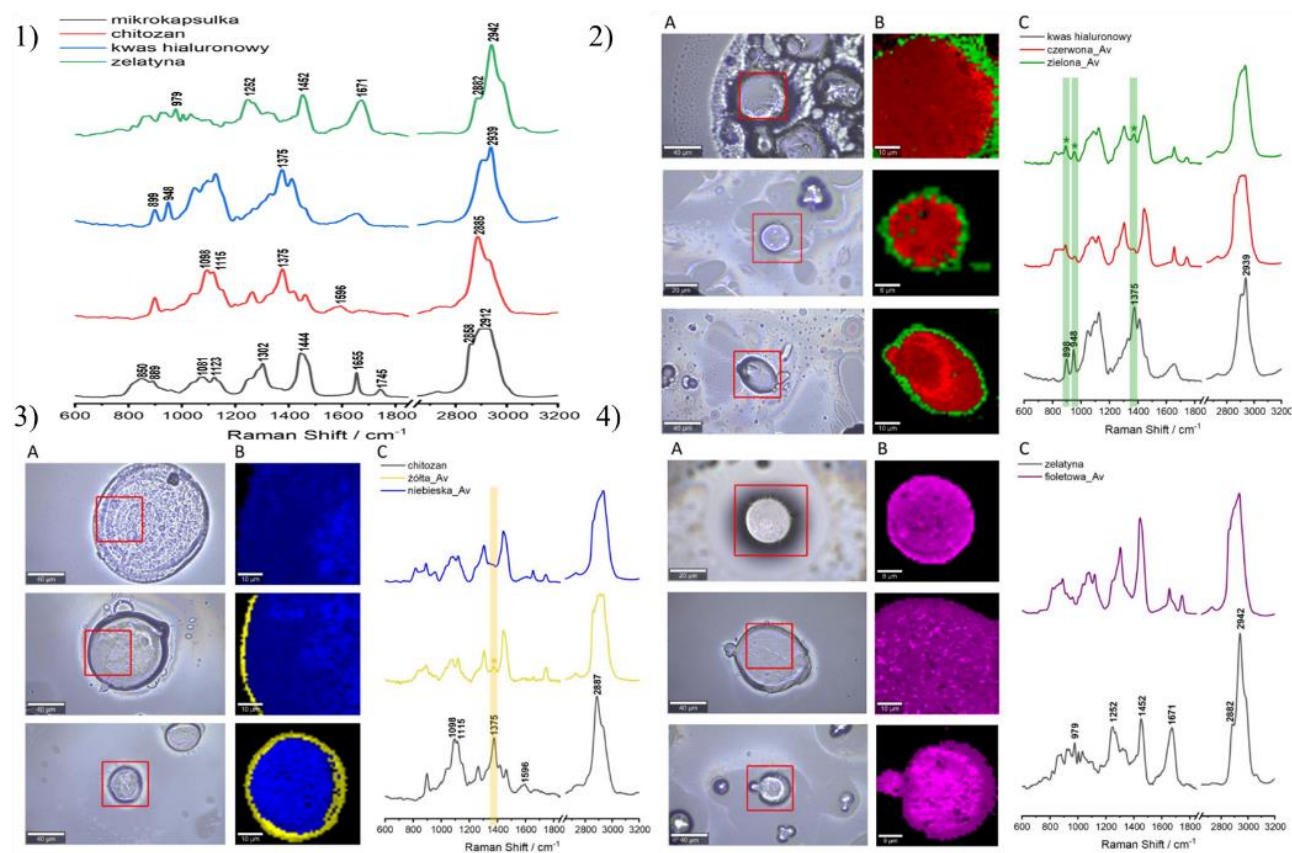
Rodzaj oleożelu	Technika enkapsulacji	Po 7 dniach		Po 30 dniach	
		Żywotność komórek [log CFU/g]	Redukcja [log CFU/g]	Żywotność komórek [log CFU/ g]	Redukcja [log CFU/g]
Aerosil 200	Emulsyfikacja	3,82	1,98	1,83	3,97
	Ekstruzja	3,28	2,52	1,28	4,52
Sucragel	Emulsyfikacja	3,65	2,15	1,99	3,81
	Ekstruzja	3,32	2,48	1,36	4,44

Chociaż wyniki badań dotyczące wprowadzenia mikrokapsulek probiotycznych do oleożeli są obiecujące, należy przeprowadzić więcej badań nad dostarczaniem probiotyków przy użyciu takich systemów, aby zweryfikować zalety proponowanego rozwiązania.

7.3. Modyfikacja mikrosfer alginianowych

Następnym etapem pracy była modyfikacja struktury nośników, przeprowadzona w celu maksymalnego uszczelnienia struktury mikrosfer alginianowych oraz zwiększenia stopnia przeżywalności bakterii probiotycznych zamkniętych wewnątrz nośników [5C]. W tym celu zastosowano dodatek prebiotyku, gdyż połączenie pro- i prebiotyków skutkuje aktywnością synbiotyczną, która poprawia przeżywalność drobnoustrojów [57]. W tym celu jako prebiotyk zastosowano mąkę z tapioki, ponieważ już sam jej dodatek miał pozytywny wpływ na wzrost szczepu *L. casei* podczas fermentacji bulionu MRS. Optymalny skład mikrosfer wybrano stosując ponownie metodę DoE [5C]. Partie mikrosfer przygotowano na podstawie wyników planu frakcyjnego $3^{(K-P)}$. Zanalizowano wpływ parametrów wejściowych (zmienne niezależne): stężenie emulgatora, prebiotyku i alginianu sodu oraz stosunek masowy alginianu sodu do prebiotyku na parametry wyjściowe (zmienne zależne), czyli właściwości fizykochemiczne takie jak rozmiar mikrosfer i lepkość, a także na EE i przeżywalność probiotyków w otrzymanych układach. Optymalne mikrosfery alginianowo – tapiokowe zostały dodatkowo poddane procesowi powlekania, aby uszczelnić ich strukturę i uzyskać maksymalny poziom hermetyczności nośnika. W tym celu jako dodatki powlekające zostały dobrane: roztwory

biopolimerów takich jak żelatyna, chitozan i kwas hialuronowy. Strukturę chemiczną mikrosfer scharakteryzowano wykorzystując spektroskopię FT-IR. Natomiast do potwierdzenia skuteczności powlekania mikrosfer wybranymi biopolimerami zastosowano spektroskopię Ramana (Rysunek 11).



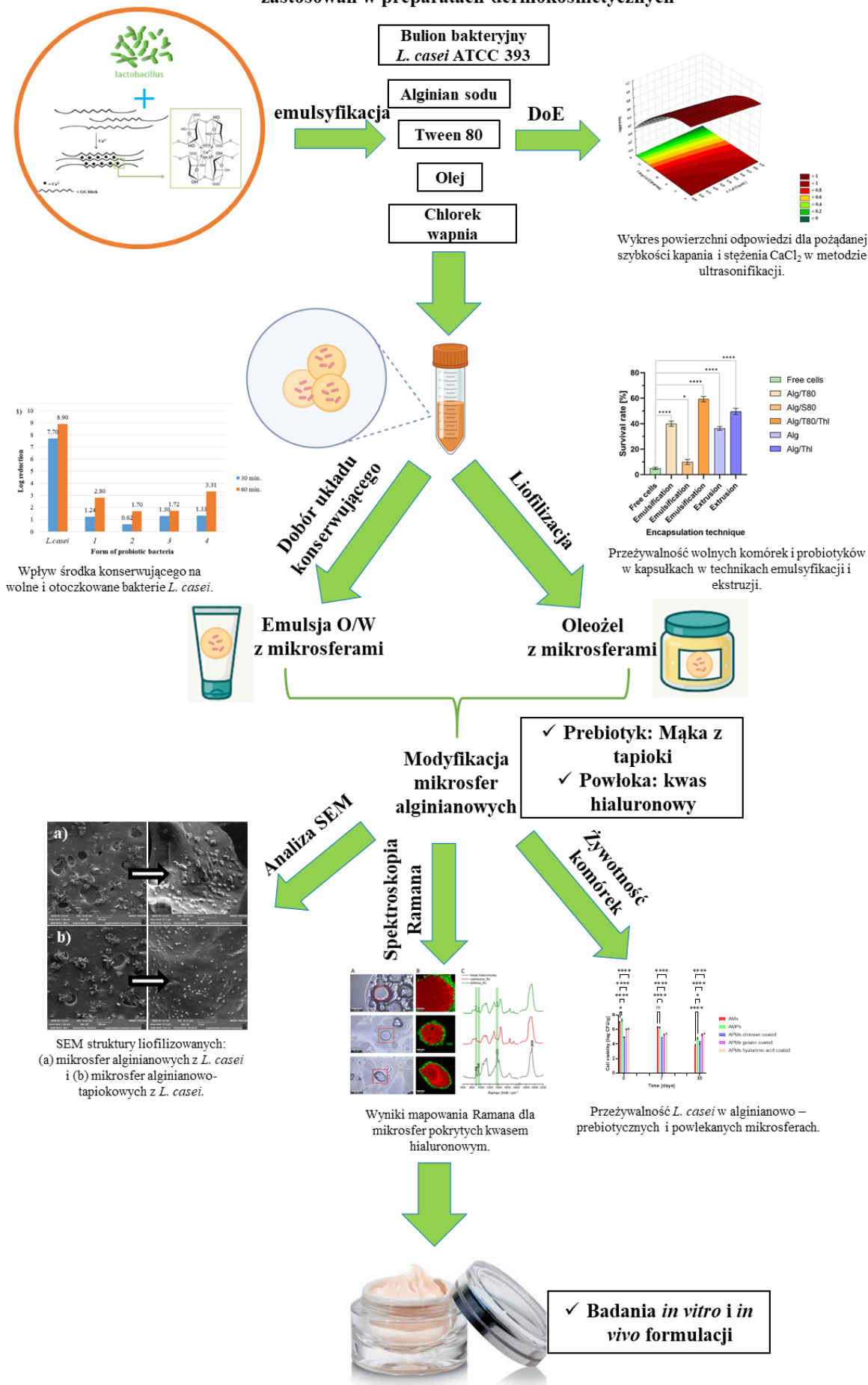
Rysunek 11. 1) Porównanie widm standardów – kwasu hialuronowego, chitozanu i żelatyny ze średnim widmem niepowlekaných mikrosfer, 2) wyniki mapowania ramanowskiego dla wybranych mikrosfer pokrytych kwasem hialuronowym, 3) chitozanem, 4) żelatyną. Obrazy widzialne z zaznaczeniem obszarów pomiarowych (A) wraz z analizą KMC (B) i średnimi widmami dla klas (kolory widm odpowiadają kolorom klas na obrazach KMC) zestawionymi z widmem standardu (C).

Otrzymane na tym etapie badań wyniki wykazały, że już sam dodatek mąki z tapioki (powłoki prebiotycznej) miał pozytywny wpływ na modyfikację powierzchni mikrosfer (wygładzenie porowatej struktury). Dodatkowe powlekanie biopolimerami pozwoliło uzyskać maksymalny stopień hermetyczności. Ponadto połączenie powłok: prebiotycznej i biopolimerowej mikrosfer, w szczególności przy użyciu kwasu hialuronowego i chitozanu, znacząco poprawiło przeżywalność i żywotność szczepu probiotycznego podczas długoterminowego przechowywania. Najwyższy wskaźnik przeżywalności szczepu probiotycznego odnotowano dla mikrosfer alginianu i mąki z tapioki pokrytych kwasem hialuronowym, na poziomie 5,48 log CFU/g. Stopień przeżywalności *L. casei* w tym układzie nośnikowym wyniósł 89% po 30 dniach przechowywania (dla mikrosfer alginianowych bez dodatku prebiotyku i powlekania parametry te osiągnęły kolejno wartości 3,99 log CFU/g i 55,6%) [5C].

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach realizacji pracy doktorskiej, przedstawione w cyklu publikacji [1C – 7C], pozwoliły na opracowanie stabilnych produktów kosmetycznych w formie emulsji O/W i oleożelu, zawierających, jako składnik aktywny, żywe szczepy bakterii probiotycznych. Wyniki badań, potwierdziły, że zastosowanie enkapsulacji bakterii w nośniku alginianowym, pozwoliło na ochronę probiotycznych mikroorganizmów przed działaniem środków konserwujących, będących niezbędnymi składnikami formułacji emulsyjnych. Podsumowanie badań przeprowadzonych w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej w formie graficznego abstraktu przedstawia Rysunek 12.

W ostatnim etapie badań, przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej, dokonano oceny efektywności działania kosmetyku zawierającego zakapsułkowane bakterie kwasu mlekowego. Badania dotyczące wpływu formułacji probiotycznej na mikrobiom skóry zostały opisane w rozdziale 8 pracy.

Enkapsulacja probiotyków w nośnikach alginianowych do zastosowań w preparatach dermokosmetycznych



Rysunek 12. Schemat prac badawczych składających się na rozprawę doktorską.

8. Ocena wpływu kosmetyku z probiotykiem na mikrobiom skóry

W celu weryfikacji efektywności działania, wpływu formułacji zawierającej bakterie probiotyczne na mikrobiom skóry, przeprowadzono badania *in vitro* i *in vivo* – z udziałem probantów.

8.1. Materiały i metody

8.1.1. Materiały

W badaniach wykorzystano następujące szczepy mikroorganizmów: *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49134, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* DSM 1790, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717, *Staphylococcus hominis* DSM 20329, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* PCM 2999. Szczepy uzyskano z następujących kolekcji: American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) i z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM). Podczas badania do namnażania *L. casei* i innych bakterii użyto bulionu de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) i bulionu Tryptic Soy Broth (TSB). Kultury macierzyste przygotowano w glicerolu (20%) i przechowywano w temperaturze -70°C. Badane szczepy grzybów drożdżopodobnych hodowano i przechowywano w formie skosów na agarze dekstrozowym Sabourauda (S) w temperaturze 4°C, a następnie przenoszono na świeże podłoże co 4 – 8 tygodni. Wszystkie podłoża oraz ich składniki zakupiono od Biomaxima (Polska).

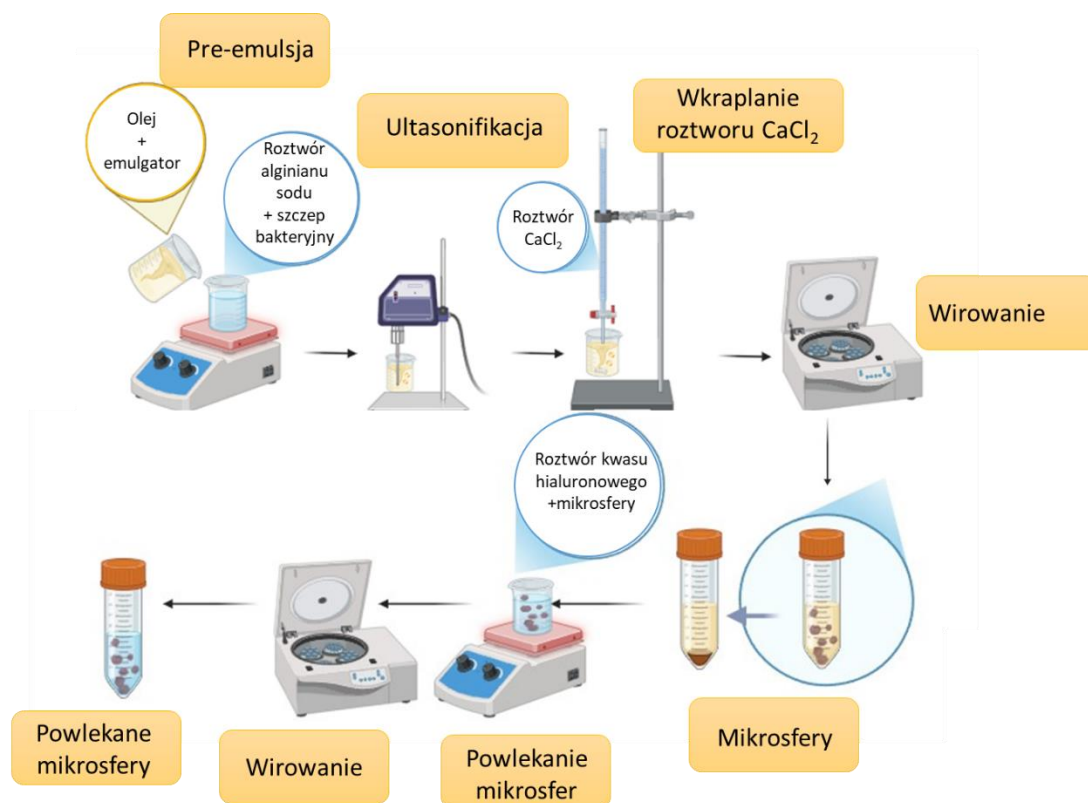
Sól sodowa kwasu alginowego z alg brunatnych i cytrynian sodu zakupiono od Sigma Aldrich (Polska). Mąkę z tapioki dostarczyła firma Green Essence (Polska). Chlorek wapnia zakupiono od Avantor Performance Materials Poland S.A. (Polska). Triglicerydy kaprylowe/kaprynowe, ECO-Tween 80 i sól sodowa kwasu hialuronowego (0,05 - 0,1 MDa) zostały uprzejmie dostarczone przez Croda (Polska) i Alfa Sagittarius (Polska). Olej z nasion łąkowej piany zakupiono od Piping Rock Health Products (USA). Dermosoft® 1388 (INCI: Aqua; Glycerin; Sodium Levulinate; Sodium Anisate) nabyto od Evonik Industries AG, a benzoesan sodu i gumę ksantanową zakupiono w Warchem Polska. NatraGem™ (INCI: Glyceryl Stearate, Polyglyceryl-6 Palmitate/Succinate, Cetearyl Alcohol) i Arlacial™ 2121 (INCI: Sorbitan Stearate, Sucrose Cocoate) zostały uprzejmie dostarczone przez Croda (Polska). Jako rozpuszczalnik zastosowano wodę dejonizowaną.

8.1.2. Określenie wpływu szczepu *L. casei* na szczepy *S. aureus* oraz *S. epidermidis*

Aktywność szczepu bakterii probiotycznych *L. casei* ATCC 393 w stosunku do szczepów *S. aureus* ATCC 6538 oraz *S. epidermidis* ATCC 49134 określano metodą dyfuzji agarowej (agar-well diffusion method) zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [95]. Ocenie poddano supernatanty 24-godzinnej hodowli szczepu *L. casei*, wyhodowanego na płynnym podłożu MRS w temp. 37°C, które zostały przygotowane zgodnie z procedurą opisaną przez Chi-Chung Chen i współ. [96]. W skrócie, 100µl bezkomórkowego supernatantu szczepu *L. casei* wypełniono studzienkę o średnicy 6 mm, wcześniej wyciętą w podłożu TSA, zawierającym *S. aureus* lub *S. epidermidis*. Średnicę strefy zahamowania wzrostu oceniano po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C. Eksperyment przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wynik uznano za pozytywny, jeśli strefa zahamowania była większa niż 1 mm [97].

8.1.3. Enkapsulacja probiotyków

Mikrosfery polimerowe przygotowano zgodnie ze zmodyfikowaną metodologią opisaną w publikacji [2C] oraz w patencie PL 246674 [6C]. Jako materiał współkapsułkujący zastosowano mąkę z tapioki. Po zakapsułkowaniu mikrosfery pokryto kwasem hialuronowym zgodnie z metodologią opisaną w manuskrypcie [5C]. Schemat procesu otrzymywania nośników zawierających żywe bakterie *Lactobacillus* przedstawiono na Rysunku 13. Otrzymane mikrosfery probiotyczne w kolejnym etapie zastosowano jako składnik aktywny w kosmetyku emulsyjnym.



Rysunek 13. Schematyczny opis procesu enkapsulacji bakterii probiotycznych.

8.1.4. Przygotowanie formulacji probiotycznej (formulacja bazowa – E1 i z MP – E2)

Emulsje przygotowano zgodnie z metodologią opisaną w publikacji [3C] oraz zgłoszeniu patentowym P. 445990 [7C]. Ramowy skład formulacji przedstawiono na stronie 31, a jako składnik aktywny zastosowano powlekane mikrosfery probiotyczne – prebiotyczne. Obie fazy (olejową i wodną) podgrzano do temperatury 70°C, a następnie połączono i mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego (IKA C-MAG HS 7), stosując obroty 600 obr./min, przez 15 min. W przypadku formulacji E2 mikrosfery probiotyczne dodano po schłodzeniu układu do temperatury poniżej 40°C, mieszanie kontynuowano, stopniowo chłodząc układ do temperatury 25°C.

8.1.5. Właściwości fizykochemiczne i żywotność probiotyków w formulacjach

Właściwości fizykochemiczne formulacji oceniano zgodnie z metodyką opisaną w publikacji [3C]. Stabilność emulsji badano dwoma metodami, wstępnie stosując test wirówkowy, a następnie test szoków termicznych. Wartości pH mierzono za pomocą pH-metru Mettler Toledo Seven Easy wyposażonego w szklaną elektrodę Inlab 410. Średnią wielkość kropli w produktach mierzono za pomocą mikroskopu optycznego (Motic) wyposażonego

w kamerę cyfrową i podłączonego do oprogramowania do przetwarzania obrazu cyfrowego (Motic Images Plus 2.0). Badania reologiczne formułacji wykonywano przy użyciu reometru rotacyjnego (Brookfield model R/S plus), wyposażonego w układ pomiarowy stożek/płytki (C-25-2), w zakresie szybkości ścinania $1\text{--}100\text{ s}^{-1}$, w temperaturze 25°C . Przeżywalność bakterii probiotycznych w formułacji kosmetycznej sprawdzono stosując procedurę opisaną w publikacjach [3C] i [4C]. W skrócie, 1 g formułacji zawierających mikrosfery o początkowej gęstości $10,50\text{ log CFU/g}$ rozcieńczano w 9 ml $0,2\text{ mol/l}$ sterylnego roztworu cytrynianu sodu ($\text{pH} = 6,0$), a następnie wytrząsano przy 2000 obr./min przez 5 min. Następnie $0,1\text{ ml}$ seryjnych rozcieńczeń umieszczano na agarze MRS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 h. Przeżywalne komórki zliczano jako liczbę kolonii uzyskanych po 72 h inkubacji w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Wszystkie testy wykonywano w trzech powtórzeniach, zachowując zasady sterylności. Wyniki przedstawiono jako logarytm jednostek tworzących kolonie na gram (log CFU/g).

8.1.6. Ocena czystości mikrobiologicznej

Oceny czystości mikrobiologicznej kosmetyków (bazy i formułacji z MP) dokonano w oparciu o obowiązujące dla kosmetyków normy: PN-EN ISO 22718: 2016-01 [98], PN-EN ISO 22717: 2016-01 [99], PN-EN ISO 21150: 2016-01 [100], PN-EN ISO 18416: 2016-01 [101], PN-EN-ISO 21149: 2017-07 [102]. Zgodnie z wymaganiami przedstawionymi w normie PN-EN ISO 17516: 2014 [13], badanie jakościowe kosmetyku powinno wykluczać obecność następujących drobnoustrojów chorobotwórczych: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans* w 1 g lub 1 ml kosmetyku. Kryteria akceptacji czystości mikrobiologicznej kosmetyków dla badań ilościowych są następujące: kosmetyki dla dzieci oraz przeznaczone do stosowania w okolicy oczu lub na błony śluzowe (kategoria I): maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi $2 \cdot 10^2\text{ CFU/g}$ lub ml, natomiast pozostałe kosmetyki (kategoria II) maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi $2 \cdot 10^3\text{ CFU/g}$ lub ml [13].

8.1.7. Badania *in vitro* i *in vivo* formułacji z mikrosferami probiotycznymi

Badania wykonano w ramach realizowanych staży naukowych. Badania żywotności i wpływu na proliferację komórek w oparciu o test MTT, analizę poziomu interleukin IL-6 i IL-8 metodą ELISA, test gojenia się ran “scratch assay” zrealizowano w Zespole Proteolizy i Modyfikacji Potranslacyjnej Białek, Małopolskiego Centrum Biotechnologii w Krakowie. Natomiast określanie wpływu formułacji kosmetycznej zawierającej szczep *L. casei* ATCC 393

na mikroorganizmy tworzące mikrobiom skóry wykonano w Pracowni Procesów Biotechnologicznych, Sieci Badawczej Łukasiewicz w Warszawie.

8.1.7.1. Hodowla komórkowa

Przed przystąpieniem do badań przeprowadzono hodowlę komórek HaCaT (ludzkie keratynocyty) i HSF CRL-2522 (ludzkie fibroblasty skóry). Komórki hodowano w Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ThermoFisher) zawierającym 10% FBS (Thermo Scientific), 100 U/ml penicyliny (Thermo Scientific) i 100 µg/ml streptomycyny (Thermo Scientific) w temperaturze 37°C/5% CO₂. Komórki dzielono dwa razy w tygodniu za pomocą trypsyny. Przed każdym eksperymentem komórki wysiewano na płytki do hodowli komórkowej zawierające DMEM bez żadnych antybiotyków (szczegóły dotyczące gęstości wysiewu podano dla każdego eksperymentu).

8.1.7.2. Badanie żywotności komórek

Komórki HaCaT i HSF posiano na 96-dołkowe płytki (odpowiednio 50 000 komórek/dołek i 30 000 komórek/dołek) dzień przed eksperymentem. Następnego dnia na komórki nałożono rozcieńczenia formułacji w DMEM. Po 24 h inkubacji usunięto podłoże, a komórki przemyto solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS) i inkubowano z 200 µl/dołek 0,5 mg/ml bromku tetrazolowego błękitu tiazolilowego (Sigma-Aldrich) w DMEM przez 20–40 min w temperaturze 37°C/5% CO₂. Podłoże usunięto, a kryształ formazanu rozpuszczono w 120 µl izopropanolu (POCH, Polska) zakwaszonego 5 mM kwasem solnym (POCH, Polska). Próbkę (90 µl) z każdego dołka przeniesiono na nową, przezroczystą 96-dołkową płytkę. Absorbancję próbki mierzono przy użyciu spektrofotometru mikropłytkowego Hidex Sense (Hidex) przy długości fali $\lambda=570$ nm. Wyniki obliczono w porównaniu do kontroli (tylko DMEM).

8.1.7.3. Badanie wpływu na proliferację komórek

Komórki HaCaT i HSF posiano na 96-dołkowe płytki (odpowiednio 5000 komórek/dołek i 10 000 komórek/dołek) dzień przed eksperymentem. Następnego dnia rozcieńczenia formułacji w DMEM nałożono na komórki hodowane w DMEM zawierającym 2% surowicy bydlęcej (FBS). Po 48 h usunięto medium, a komórki przemyto PBS i inkubowano z 200 µl/dołek 0,5 mg/ml bromku tetrazolowego błękitu tiazolilowego (Sigma-Aldrich) w DMEM przez 20 min (HaCaT) lub 1 h (HSF) w 37°C/5% CO₂. Medium usunięto, a kryształ formazanu rozpuszczono w 120 µl izopropanolu (POCH, Polska) zakwaszonego 5 mM kwasem

solnym (POCH, Polska). Próbkę (90 μ l) z każdego dołka przeniesiono do nowej, przezroczystej płytki 96-dołkowej. Absorbancję próbki mierzono przy użyciu czytnika mikropłytek Hidex Sense (Hidex) przy długości fali $\lambda=570$ nm. Wyniki obliczono w porównaniu do kontroli niestymulowanej (tylko DMEM).

8.1.7.4. Wpływ formulacji na uwalnianie cytokin

Komórki wysiewano w gęstości 100 000 komórek na dołek (komórki HaCaT) i 50 000 komórek na dołek (komórki HSF) na 48-dołkowe płytki na dzień przed eksperymentem. Kultury konfluentne stymulowano różnymi stężeniami formulacji (rozcieńczonymi w 350 μ l DMEM). Po 24 h zebrano media komórkowe i przechowywano je w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

8.1.7.5. ELISA

Poziomy cytokin prozapalnych, IL-6 i IL-8, w podłożu do hodowli komórkowej mierzono przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (R&D) zgodnie z instrukcją producenta. Płytki 96-dołkowe o połowie powierzchni i wysokim wiązaniu (Greiner) pokryto odpowiednimi przeciwciałami powlekającymi rozcieńczonymi w PBS. Następnego dnia dołki przemyto buforem do przemywania (0,05% Tween w PBS) i zablokowano na 1 h w temperaturze pokojowej ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 150 μ l 1% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) rozcieńczonej w PBS. Dołki przemyto i dodano do nich 50 μ l próbek, a następnie inkubowano przez 2 h w temperaturze pokojowej ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Po dokładnym przemyciu komórki w dołkach inkubowano z przeciwciałami pierwotnymi sprzężonymi z biotyną przez 2 h i ponownie przemyto. Następnie dołki inkubowano ze streptawidyną-HRP przez 30 min. Przed wywołaniem studzienki przemyto pięć razy, a do każdej studzienki dodano 50 μ l roztworu substratu TMB (zestaw odczynników substratu TMB, BD). Po wywołaniu sygnału reakcję zatrzymano za pomocą 25 μ l 2N H_2SO_4 (POCH). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda=450$ nm i $\lambda=570$ nm.

8.1.7.6. Test gojenia się ran “scratch assay”

Wkładki (ibidi) przeniesiono na płytkę 12-dołkową. Komórki HaCaT (600 000 komórek/dołek) posiano wokół i w komorach wkładki w DMEM zawierającym 10% FBS. Po całonocnej inkubacji wkładki usunięto, a komórki obrazowano za pomocą systemu obrazowania komórek (powiększenie 4X) (EVOS FL, Thermo Scientific). Medium usunięto, a komórki stymulowano formulacjami o stężeniach 0,5% i 2% (rozcieńczonymi w DMEM

zawierającym 2% FBS przez 15 h). Po inkubacji komórki obrazowano. Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania TScratch (19450233, CSE Lab, ETH Zurich).

8.1.7.7. Określanie wpływu formulacji kosmetycznej zawierającej szczep *L. casei* na mikroorganizmy tworzące mikrobiom skóry

Badania wykonano według metodyki zaproponowanej przez Jałosińską [103] po zastosowaniu pewnych modyfikacji. W tym celu 5 g porcje formulacji kosmetycznej (E2) zawierającej szczep *L. casei* zamknięty w mikrosferach, zaszczerpiono zawiesinami szczepów referencyjnych wymienionych w rozdziale 8.1.1. i dokładnie mieszano. Wyjściowa gęstość zawiesin inokulacyjnych szczepów mieściła się w zakresie $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^9$ CFU/ml i była sprawdzana przez posiew wgłębnny na podłożu Tryptic Soy Agar (TSA) lub Sabouraux Dextrose Agar (S) odpowiednio dla bakterii i grzybów drożdżopodobnych. Następnie w aseptycznych warunkach odważano 1 g niniejszej formulacji kosmetycznej, umieszczano w 9 ml roztworu sterylnego cytrynianu sodu o stężeniu 2 mol/l (pH = 6) w celu uwolnienia mikroorganizmów z MP. Po serii rozcieńczeń, żywotność mikroorganizmów testowych wprowadzonych do formulacji kosmetycznej określano metodą płytkową wgłębną stosując następujące podłoża selektywne: Baird Parker Agar (BPA) (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis subsp. urealyticus*, *S. hominis*), Sabouraud Dextrose Agar (*C. albicans*, *C. neoformans*), MacConkeya Agar (*E. coli*), FTO Agar (*M. luteus*). Inkubację prowadzono w następujących warunkach: bakterie: 37°C, 48 h, grzyby drożdżopodobne: 28°C, 48 h. Oznaczenia żywotności mikroorganizmów testowych w formulacji kosmetycznej z probiotykami wykonano bezpośrednio po wprowadzeniu zawiesin mikroorganizmów do preparatu, a także po jej inkubacji w temperaturze 37°C przez 2 h i 24 h. Analogiczną procedurę zastosowano wobec preparatu niezawierającego MP (E1). Doświadczenie powtórzono dwukrotnie. Wyniki oznaczeń podawano jako log liczby jednostek tworzących kolonie CFU w 1 g danej formulacji i zostały wykorzystane do obliczenia średniego przyrostu lub redukcji komórek mikroorganizmów referencyjnych wprowadzonych do formulacji kosmetycznych po określonym czasie.

8.1.7.8. Badania *in vivo* potwierdzające skuteczność działania kosmetyków z probiotykiem

Badanie zostało przeprowadzone na grupie 20 probantów (kobiet i mężczyzn w wieku 27 – 72 lat). Materiał do badań pobrano zarówno w czasie 0 (przed użyciem badanego preparatu) jak i w czasie 2 h po zastosowaniu produktu. Z wykorzystaniem sterylnego szablonu o powierzchni 25 cm² pobrano wymazy ze skóry policzka. Do pobrania wymazu użyto sterylnych wymazówek z podłożem transportowym (system e-Swab). Następnie materiał do

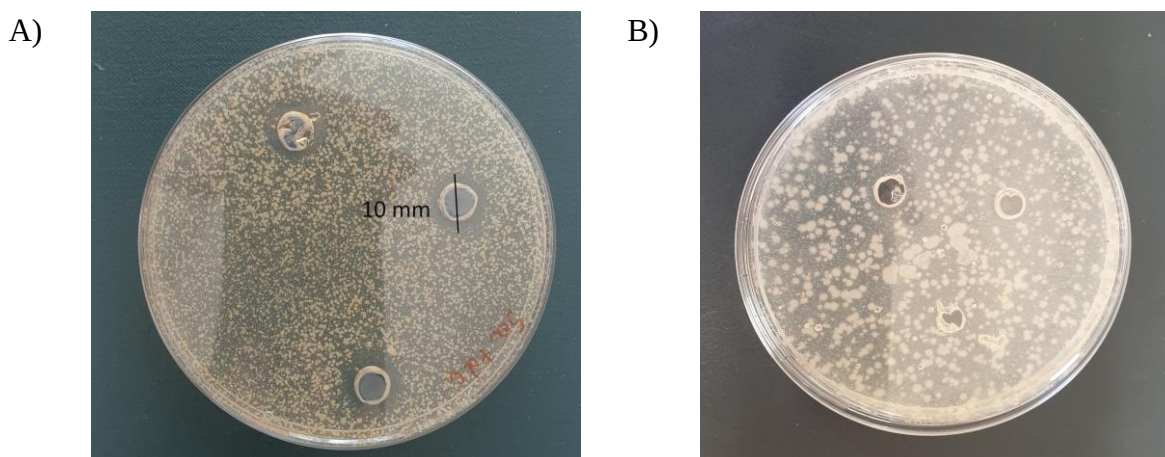
badan wysiano na podłoża hodowlane ilościowo oraz jakościowo. Ilościową analizę wykonano z użyciem metody seryjnych rozcieńczeń Kocha. Wymazówkę zanurzano w 10ml zbuforowanej wodzie peptonowej. Wykonywano 10-krotne rozcieńczenia badanych próbek (posiew bezpośredni do 10^{-4}). Wysiewano po 100 μ l na płytki z podłożem odżywczym. Płytki inkubowano w temperaturze $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (95% powietrza, 5% CO_2). Po upływie czasu inkubacji (72 ± 3 h) zliczono wyrosłe kolonie bakteryjne. Identyfikację przeprowadzono metodą spektrometrii masowej MALDI TOF MS (801/BUD2/0253, Biotyper, Bruker) z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu.

8.2. Wyniki i dyskusja wyników

8.2.1. Aktywność szczepu probiotycznego wobec *S.epidermidis* i *S.aureus*

W celu potwierdzenia wpływu formułacji z bakteriami probiotycznymi na mikrobiom skóry w pierwszej kolejności określono aktywność samego probiotycznego szczepu na najpowszechniejsze mikroorganizmy tworzące mikrobiom skóry, a więc *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49134 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Zastosowano szczepy będące izolatami pochodzącymi z ludzkiej skóry. Badania wykonano metodą studzienkowo-dyfuzyjną.

Wykazano, że szczep *L. casei* ATCC 393 jest aktywny wobec szczepu *S. aureus* ATCC 6538, o czym świadczy obecność przejrzystych stref wokół dołków, których średnica przekracza 10 mm (Rysunek 14A).



Rysunek 14. Wpływ szczepu *L. casei* ATCC 393 na szczepy A) *S. aureus* ATCC 6538 i B) *S. epidermidis* ATCC 49134.

Wyniki są zgodne z badaniami Khmaladze i współautorów [51], u których probiotyczny szczep *L. reuteri* DSM 17938 również wykazywał działanie przeciwbakteryjne przeciwko

patogennym mikroorganizmom skóry. Z kolei, w przypadku *S. epidermidis* nie stwierdzono stref zahamowania wzrostu (Rysunek 14B), co może wskazywać na brak wpływu *L. casei* na ten szczep. Jest to zatem pozytywna informacja, gdyż *S. epidermidis* należy do gatunków komensalnych, które odgrywają istotną rolę w utrzymaniu równowagi w składzie ilościowym i jakościowym mikrobiomu skóry człowieka.

8.2.2. Właściwości fizykochemiczne i żywotność probiotyków w preparatach miejscowych

Następnie, do formułacji bazowej opisanej we wcześniejszej publikacji [3C] oraz objętej zgłoszeniem patentowym P. 445990 [7C], jako składnik aktywny dodano zmodyfikowane mikrosfery alginianowo – tapiokowe pokryte kwasem hialuronowym zawierające bakterie probiotyczne (szczep *Lactobacillus casei* ATCC 393). Właściwości fizykochemiczne formułacji bazowej — E1 i formułacji zawierającej mikrosfery probiotyczne — E2 przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Właściwości fizykochemiczne i żywotność probiotyków w emulsjach.

Parametr	E1	E2
Stabilność – metoda wirówkowa	+	+
Stabilność – metoda szoków termicznych	+	+
pH	5,8 ($\pm$ 0,1)	5,8 ($\pm$ 0,1)
Średnia średnica kropli fazy wewnętrznej [μ m]	10,6 ($\pm$ 0,4)	8,60 ($\pm$ 0,89)
Lepkość przy prędkości ścinania $v=50 \text{ s}^{-1}$ [Pa·s]	17,0 ($\pm$ 0,5)	16,0 ($\pm$ 0,8)
Żywotność komórek [log CFU/g]	0,0 ($\pm$ 0,0)	7,8 ($\pm$ 1,2)

Wyniki te potwierdzają, że uzyskano stabilne emulsje O/W o jednolitej, gładkiej konsystencji i wartości pH odpowiadającej fizjologicznemu pH skóry, zawierające żywe bakterie probiotyczne. Żywotność bakterii *L. casei* w mikrosferach po włączeniu do formułacji była na poziomie 7,80 log CFU/g, co oznacza redukcję o 2,70 log w porównaniu z początkowym ładunkiem bakteryjnym w mikrosferach. Jest to zadawalający wynik potwierdzający znaczną przeżywalność mikroorganizmów w preparacie pomimo obecności środków konserwujących.

8.2.3. Ocena czystości mikrobiologicznej

Wyniki badania czystości mikrobiologicznej opracowanych formułacji przedstawiono w Tabeli 5 i 6.

Tabela 5. Ocena czystości mikrobiologicznej formulacji bazowej (E1).

Nazwa oznaczenia	Jednostka	Wyniki oznaczenia	Wymagania zgodne z PN-EN 17516:2014	Metoda oznaczania
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych (bakterie+ drożdże i pleśń)	CFU/g	≤ 10	$\leq 1 \cdot 10^3$ CFU/g lub ml	PN-EN ISO 21149; 2017-07; PN-EN ISO 16212; 2017-08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 22717; 2016-01
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 22718; 2016-01
<i>Escherichia coli</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 21150; 2016-01
<i>Candida albicans</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 18416; 2016-01

Tabela 6. Ocena czystości mikrobiologicznej formulacji zawierającej MP (E2).

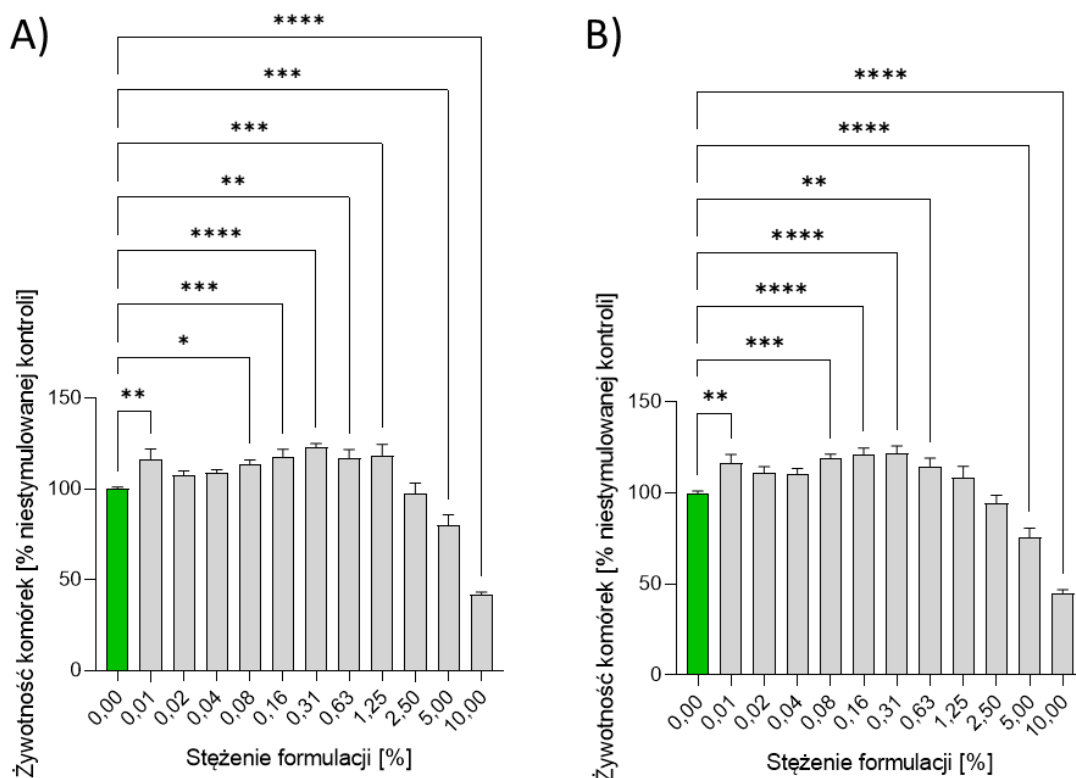
Nazwa oznaczenia	Jednostka	Wyniki oznaczenia	Wymagania zgodne z PN-EN 17516:2014	Metoda oznaczania
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych (bakterie+ drożdże i pleśń)	CFU/g	$\leq 9,4 \cdot 10^2$	$\leq 1 \cdot 10^3$ CFU/g lub ml	PN-EN ISO 21149; 2017-07; PN-EN ISO 16212; 2017-08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 22717; 2016-01
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 22718; 2016-01
<i>Escherichia coli</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 21150; 2016-01
<i>Candida albicans</i>	CFU/g	Brak obecności w 1 g próbki	Nieobecna w 1 g lub 1ml	PN-EN ISO 18416; 2016-01

Otrzymane wyniki potwierdziły, że obie formulacje, zarówno bazowa (E1) (Tabela 5) jak również emulsja z MP (E2) (Tabela 6) spełniają wymagania mikrobiologiczne stawiane kosmetykom kategorii II. W 1 g próbki nie stwierdzono obecności patogenów z gatunku:

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans* oraz zawartości tlenowych mezofilnych mikroorganizmów (bakterii, pleśni i drożdży) w 1 g próbki znajdowała się na dopuszczalnym poziomie ≤ 10 dla E1 i $\leq 9,4 \cdot 10^2$ dla E2. Otrzymane wyniki potwierdzają, że zastosowanie mikrosfer alginianowych jako nośników bakterii probiotycznych chroni produkt przed niekontrolowanym rozwojem bakterii, zapewniając odpowiednią czystość mikrobiologiczną. Równocześnie chroni też probiotyk przed działaniem środka konserwującego, co potwierdziły badania żywotności zakapsułkowanych bakterii probiotycznych w formulacji kosmetycznej, z których wynikało, że przeżywalność *L. casei* utrzymywała się na poziomie $1,35 \cdot 10^6$ CFU/g (6,13 log CFU/g), nawet po 120 dniach przechowywania preparatu [3C].

8.2.4. Badania *in vitro* formulacji

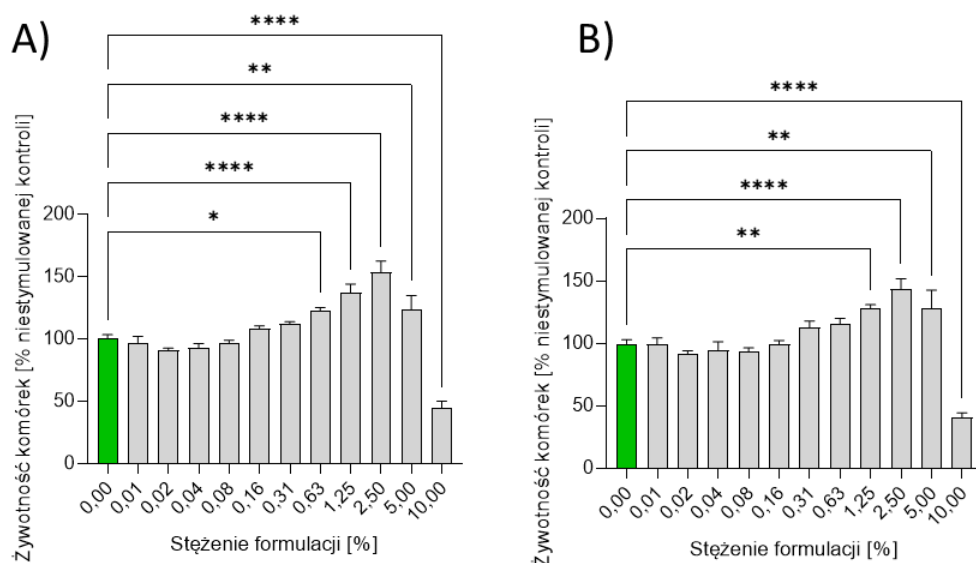
W celu potwierdzenia braku toksyczności próbek przeprowadzono badania na modelu komórkowym imitującym ludzką skórę. Do badań wybrano ludzkie komórki typu keratynocytów (HaCaT) (Rysunek 15) i fibroblastów (HSF) (Rysunek 16). Linie te stanowią popularny model oceny cytotoksyczności oraz w kontekście testowania materiałów do stosowania jako preparaty miejscowe. Wysoce konfluentne komórki (~90%) inkubowano przez 24 h z seryjnymi rozcieńczeniami każdego preparatu przygotowanego w DMEM, a następnie wykonano test żywotności MTT.



Rysunek 15. Test żywotności komórek HaCaT (MTT) w A) preparacie bazowym i B) zawierającym MP. Wyniki obliczono jako procent komórek kontrolnych inkubowanych w obecności samego DMEM i przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. *— $p = 0,05\text{--}0,011$; ** — $p \leq 0,01$; ***— $p \leq 0,001$; ****— $p \leq 0,0001$. Zielony pasek oznacza kontrolę niestymulowaną.

Z danych przedstawionych na rysunku 15 wynika, że opracowane preparaty nie wykazywały negatywnego wpływu na żywotność komórek keratynocytów do stężenia 2,5%. Stężenie kosmetyku na poziomie 5% spowodowało $\sim 25\%$ spadek żywotności komórek (IC₂₅), a IC₅₀ osiągnięto przy stężeniach około 10% dla obu formacji. Należy zauważyć, że wyniki zarówno dla formacji bazowej, jak i emulsji zawierającej MP są podobne, co pozwala wnioskować, że stosowanie mikrosfer nie wpływa negatywnie na żywotność keratynocytów.

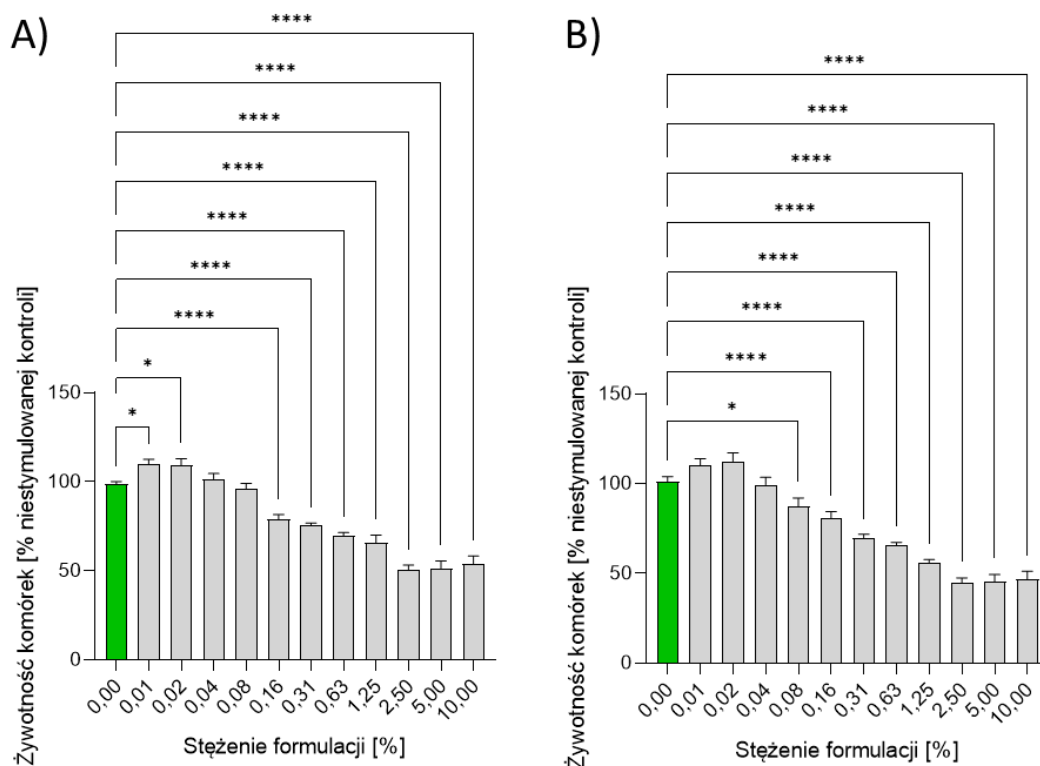
W przypadku działania formacji na komórki HSF (Rysunek 16) nie obserwuje się negatywnego wpływu formacji na fibroblasy do stężenia 5%, a IC₅₀ osiągano przy stężeniach obu formacji około 10%. Ponadto, dla stężeń preparatów w zakresie 1,25 – 5% obserwuje się wzrost liczby komórek. W przypadku wpływu na cytotoksyczność, gdzie mamy komórki konfluentne wzrost sygnału w teście MTT może być spowodowana zwiększoną aktywnością metaboliczną komórek.



Rysunek 16. Test żywotności komórek HSF (MTT) w A) preparacie bazowym i B) zawierającym MP. Wyniki obliczono jako procent komórek kontrolnych inkubowanych w obecności samego DMEM i przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. *— $p = 0,05\text{--}0,011$; ** — $p \leq 0,01$; ***— $p \leq 0,001$; ****— $p \leq 0,0001$. Zielony pasek oznacza kontrolę niestymulowaną.

Badania biologiczne przeprowadzone na komórkach: keratynocytach i fibroblastach skóry *in vitro* wskazują na podobną, stosunkowo niską cytotoksyczność obu formacji, niezależnie od obecności *L.casei*. W analizie cytotoksyczności, IC50% określone dla obu linii komórkowych, wynosiło około 10%, co wskazuje na dobrą tolerancję badanych preparatów przez komórki skóry, gdyż inne formacje miejscowe, np. w postaci kremu lub serum, osiągają 50% cytotoksyczności przy znacznie niższych stężeniach [104]. Należy jednak zauważyć, że badania obejmują czas inkubacji wynoszący 24 h. Jeśli formacja jest stosowana jako preparat miejscowy, czas kontaktu ze skórą będzie znacznie krótszy (maksymalnie kilka godzin).

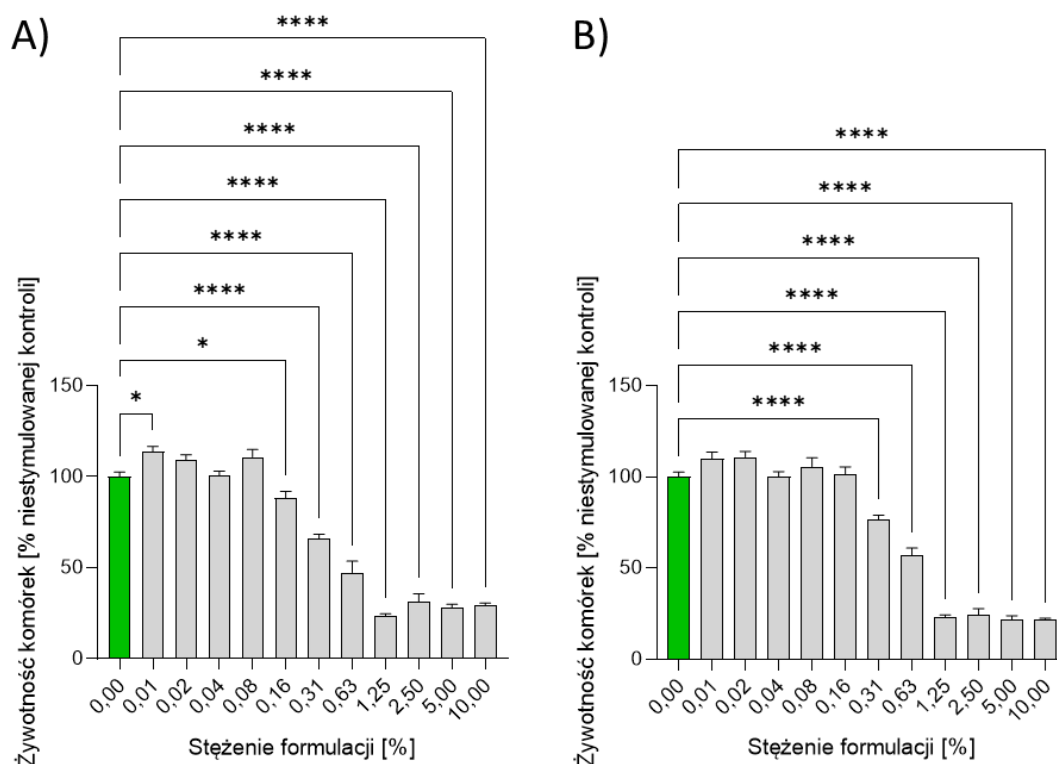
W pracy zbadano również wpływ obu formacji na proliferację komórek HaCaT (Rysunek 17) i HSF (Rysunek 18). Ponownie zastosowano test MTT, ale dodatkowo wykorzystano kultury komórek o niskiej konfluencji.



Rysunek 17. Wpływ na proliferację komórek HaCaT (MTT) w A) preparacie bazowym i B) preparacie zawierającym MP. Wyniki obliczono jako procent komórek kontrolnych inkubowanych w obecności DMEM + FBS i przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. *— $p = 0,05$ – $0,011$; ** — $p \leq 0,01$; ***— $p \leq 0,001$; ****— $p \leq 0,0001$. Zielony pasek wskazuje kontrolę niestymulowaną.

Wyniki pokazują zmniejszoną proliferację komórek HaCaT stymulowanych stężeniami formacji powyżej 0,08-0,16% (Rysunek 17). Jednak przy niższych stężeniach stymulantów zaobserwowano niewielką indukcję proliferacji dla obu stosowanych formacji.

Podobną zależność obserwowano dla komórek HSF (Rysunek 18). Tutaj dla formacji bazowej nieznaczna indukcja proliferacji była widoczna do stężenia 0,08%, natomiast dla formacji zawierającej mikrosfery z probiotykami do stężenia 0,16%. Proliferacja komórek ludzkich fibroblastów została zahamowana przy wyższych stężeniach, ponieważ formacja bazowa – powyżej 0,16% i formacja probiotyczna – powyżej 0,31%, zmniejszyły obserwowaną żywotność komórek.

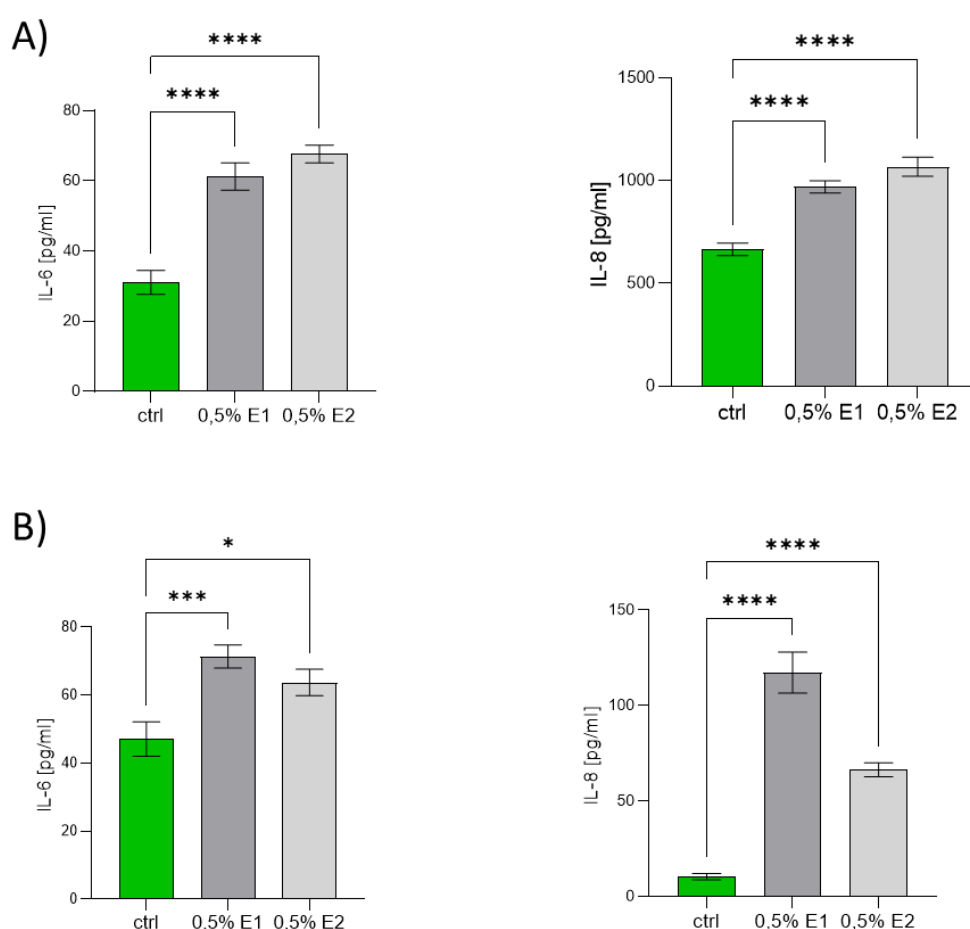


Rysunek 18. Wpływ na proliferację komórek HSF (MTT) w A) preparacie bazowym i B) preparacie zawierającym MP. Wyniki obliczono jako procent komórek kontrolnych inkubowanych w obecności DMEM + FBS i przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. *— $p = 0,05$ – $0,011$; ** — $p \leq 0,01$; ***— $p \leq 0,001$; ****— $p \leq 0,0001$. Zielony pasek wskazuje kontrolę niestymulowaną.

Następnie, stężenia formacji, które uznano za niecytotoksyczne, wybrano do dalszych badań *in vitro*, w tym profilu uwalniania cytokin mierzonego metodą ELISA i efektu gojenia ran.

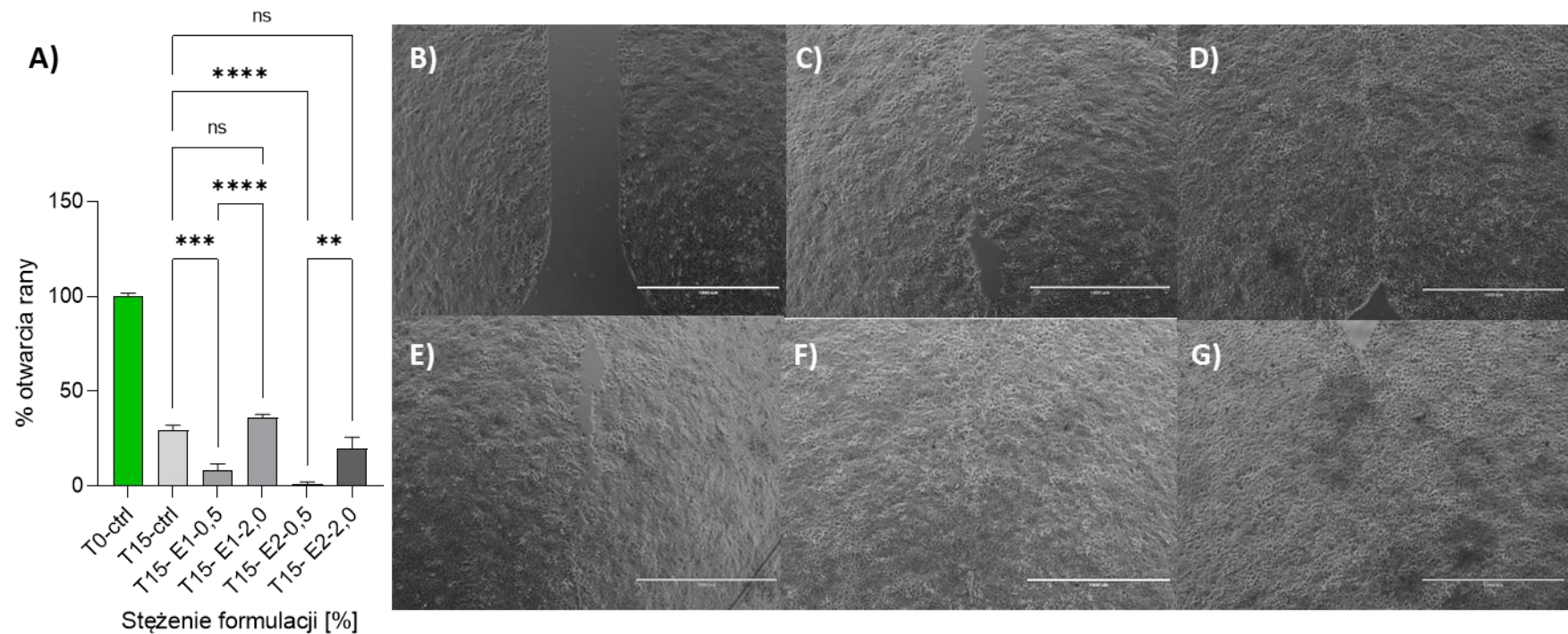
Pomiar uwalniania cytokin prozapalnych (IL-6 i IL-8) pokazuje, że w obu przypadkach formacje stymulują uwalnianie tych związków w hodowlach HaCaT i HSF (odpowiednio Rysunek 19A i 19B). W pożywkach kondycjonowanych HaCaT traktowanych 0,5% formacji poziomy IL-6 i IL-8 były o ~50% wyższe niż w komórkach niestymulowanych. W hodowli komórek fibroblastów stymulowanych formacjami zaobserwowano wzrost uwalniania IL-6 o mniej niż 40%, podobny zarówno dla pustych, jak i zawierających mikrosfery. Poziomy cytokin prozapalnych zwiększone po stymulacji testowanymi formacjami mogą wskazywać na ich słabą naturę drażniącą. Należy jednak podkreślić, że obserwowane poziomy IL-6 i IL-8 są niskie, nawet po stymulacji i są dalekie od typowej odpowiedzi, którą ten typ komórek może

wytwarzać pod wpływem bodźców prozapalnych. Dodatkowo co ciekawe, w hodowli komórek fibroblastów poziomy IL-8 również wzrósł, ale stymulacja formulacją zawierającą mikrosfery miała mniej wyraźny efekt w porównaniu z bazową formulacją. Wyniki można porównać do badań Khmaladze i współ. [51], gdzie zastosowanie zarówno żywych bakterii, jak i lizatu *L. reuteri* DSM 17938 wykazywało działanie przeciwzapalne (zmniejszyło prozapalne działanie IL-6 i IL-8). Jednak należy wziąć pod uwagę, że w badaniu tym testowano sam szczep probiotyczny, a nie formulację zawierającą probiotyczne mikroorganizmy. Wobec powyższego już samo zmodyfikowanie produkcji IL-8 w porównaniu formulacji bazowej i z MP sugeruje działanie przeciwzapalne *L. casei*.



Rysunek 19. Ekspresja cytokin w komórkach A) HaCaT i B) HSF stymulowana rozcieńczonymi preparatami bazy i zawierającymi MP przez 24 godziny. Poziom wydzielania cytokin IL-6 i IL-8 w pożywkach hodowli komórkowej po stymulacji 0,5% tych dwóch formulacji. Wykresy przedstawiają dane z trzech niezależnych eksperymentów, z trzema powtórzeniami w każdym. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą GraphPad Prism, stosując wbudowany test ANOVA (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001 i **** < 0,0001).

Dodatkowo, komórki HaCaT zostały użyte w teście zarostania rany wykorzystującym wkładki Ibidi w celu sprawdzenia regeneracyjnego efektu formułacji. Wyniki wykazały, że zarówno formułacja bazowa, jak i z mikrosferami, wykazują właściwości regeneracyjne, pozytywnie wpływają na proces gojenia się ran. Jak pokazano na Rysunku 20, powierzchnia otwartej rany wynosiła około 30% po 15 h inkubacji dla niestymulowanej kontroli. Zamknięcie rany osiągnęło około 90% w komórkach inkubowanych przez 15 h w obecności 0,5% pustej formułacji – E1. Jednocześnie, zaobserwowano praktycznie całkowite zamknięcie rany w dołkach inkubowanych z 0,5% formułacją zawierającą mikrosfery – E2.



Rysunek 20. A) Wpływ formacji E1 i E2 na proces gojenia się rany w teście zarastania rany na komórkach HaCaT. Test zarysowania wykorzystujący wkładki Ibidi do generowania rany. Konfluentne komórki HaCaT wyhodowane wokół insertów po ich usunięciu stymulowano 0,5 i 2% stężeniami formacji E1 i E2. Zamknięcie rany obserwowano za pomocą mikroskopu EVOS FL pod obiektywem 4x po 15 h stymulacji. B) kontrola w czasie „0”, C) kontrola po 15 h, D) E1 w stężeniu 0,5%, E) E1 w stężeniu 2,0%, F) E2 w stężeniu 0,5% i G) E2 w stężeniu 2,0%. Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania TScratch. Zamknięcie obszaru rany na każdym odpowiednim obrazie mierzono i przedstawiano jako procent niestymulowanej kontroli od punktu czasowego inkubacji 0 h.

Przedstawione dane dotyczące gojenia się ran wskazują zatem, że formuacja zawierająca MP może mieć potencjał jako preparat o właściwościach proregeneracyjnych, a wyniki badań pozostają w zgodzie z badaniami Peral i in. [58], w których miejscowe zastosowanie żywego *Lactobacillus plantarum* przyspieszyło gojenie się ran u diabetyków z owrzodzeniami kończyn dolnych.

8.2.5. Ocena wpływu formuacji probiotycznej na mikrobiom skóry

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu formuacji kosmetycznej zawierającej szczep *L. casei* na mikroorganizmy tworzące mikrobiom skóry. Analizie poddano działanie preparatu z mikrosferami zawierającymi szczep *L. casei* (E2) na siedem wybranych mikroorganizmów – zarówno patogennych, jak i komensalnych – stanowiących element naturalnej mikroflory skóry człowieka. Jako kontrolę zastosowano preparat niezawierający szczepu probiotycznego (E1) (Tabela 7).

Tabela 7. Ocena wpływu formulacji kosmetycznej na mikroorganizmy referencyjne występujące naturalnej mikroflorze skóry człowieka.

Mikroorganizm testowy	Preparat	Żywotność [CFU/g]	Żywotność [log CFU/g]	Żywotność po 2 h [CFU/g]	Żywotność [log CFU/g]	Redukcja [log CFU/g]	Żywotność po 24 h [CFU/ g]	Żywotność [log CFU/g]	Redukcja [log CFU/g]
<i>S. epidermidis</i>	E1	$1,40 \cdot 10^7$	7,15	$2,40 \cdot 10^7$	7,38	+0,23	$3,75 \cdot 10^7$	7,57	+0,42
	E2	$1,15 \cdot 10^7$	7,06	$1,67 \cdot 10^7$	7,22	+0,16	$2,23 \cdot 10^7$	7,34	+0,28
<i>S. aureus</i>	E1	$3,49 \cdot 10^7$	7,54	$1,30 \cdot 10^7$	7,11	- 0,43	$7,58 \cdot 10^6$	6,87	-0,67
	E2	$2,40 \cdot 10^7$	7,38	$1,00 \cdot 10^6$	6,00	- 1,38	$5,96 \cdot 10^5$	5,78	-1,60
<i>M. luteus</i>	E1	$4,68 \cdot 10^6$	6,67	$1,05 \cdot 10^7$	7,02	+0,35	$2,54 \cdot 10^7$	7,40	+ 0,73
	E2	$3,90 \cdot 10^7$	7,59	$1,24 \cdot 10^8$	8,09	+0,50	$1,50 \cdot 10^8$	8,17	+ 0,59
<i>C. neoformans</i>	E1	$1,30 \cdot 10^6$	6,11	$3,99 \cdot 10^5$	5,60	-0,50	$7,27 \cdot 10^4$	4,86	-1,25
	E2	$2,19 \cdot 10^6$	6,34	$3,90 \cdot 10^5$	5,59	-0,75	$3,30 \cdot 10^3$	3,52	- 2,82
<i>C. albicans</i>	E1	$2,32 \cdot 10^6$	6,36	$2,00 \cdot 10^6$	6,30	- 0,06	$1,58 \cdot 10^6$	6,20	- 0,16
	E2	$1,77 \cdot 10^6$	6,25	$1,13 \cdot 10^6$	6,05	- 0,20	$0,90 \cdot 10^6$	5,95	- 0,30
<i>E. coli</i>	E1	$2,09 \cdot 10^5$	5,32	$1,20 \cdot 10^5$	5,08	- 0,24	$9,36 \cdot 10^4$	4,97	- 0,35
	E2	$2,50 \cdot 10^5$	5,40	$1,10 \cdot 10^5$	5,04	- 0,36	$2,68 \cdot 10^4$	4,43	- 0,97
<i>S. capitis subsp. urealyticus</i>	E1	$2,38 \cdot 10^8$	8,38	$4,29 \cdot 10^8$	8,63	+0,25	$4,50 \cdot 10^8$	8,65	+0,27
	E2	$2,53 \cdot 10^8$	8,40	$4,14 \cdot 10^8$	8,62	+0,22	$4,41 \cdot 10^8$	8,64	+0,24
<i>S. hominis</i>	E1	$1,38 \cdot 10^7$	7,13	$1,55 \cdot 10^7$	7,19	+0,06	$2,96 \cdot 10^7$	7,47	+0,34
	E2	$1,54 \cdot 10^7$	7,19	$2,50 \cdot 10^7$	7,39	+0,20	$2,68 \cdot 10^7$	7,43	+0,24

Obie badane formuacje (E2 i E1) zaszczerpiono jednym z wybranych szczepów, a ich wzrost oceniono po 2 i 24 h inkubacji. Zaobserwowano, że wzrost komensali skórnych (*S. epidermidis*, *M. luteus*, *S. hominis*, *S. capitis subsp. urealyticus*) był umiarkowanie zwiększony po 2 h (0,16 – 0,50 log) i 24 h inkubacji (0,24 – 0,59 log) w kontakcie z formuacją E2. Efekt był jednak podobny do zaobserwowanego w kontrolnej formuacji E1 (0,06 – 0,35 log po 2 h i 0,42 – 0,73 log po 24 h, odpowiednio), co sugeruje, że obecność mikrosfer *L. casei* w formuacji E2 nie wpływa na wzrost tych szczepów komensalnych. Natomiast wzrost szczepów patogennych (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* i *C. neoformans*) w formuacji E2 został zahamowany w pewnym stopniu po 2 h (-0,20 – -1,38 log) i 24 h (-0,30 – -2,82 log), nawet w porównaniu do kontrolnej formuacji E1 (-0,06 – -0,5 log i -0,16 – -1,25 log odpowiednio dla 2 i 24-godzinne go kontaktu). Stwierdzono również, że spośród testowanych szczepów patogennych, *C. neoformans* (redukcja po 24 h o -2,82 log) i *S. aureus* (redukcja po 24 h o -1,60 log) wykazywały najwyższą wrażliwość na kontakt z formuacją E2, podczas gdy wzrost *C. albicans* został zakłócony tylko w niewielkim stopniu (redukcja po 24 godzinach o -0,30 log).

8.2.6. Badania *in vivo* potwierdzające skuteczność działania kosmetyków z probiotykiem

W ostatnim etapie badań oceniono wpływ formuacji zawierającej mikrosfery z *Lactobacillus casei* na mikrobiom skóry probantów, w celu potwierdzenia kolonizacji skóry przez szczep probiotyczny zawarty w formuacji E2. Uzyskane wyniki wskazują na skuteczną kolonizację powierzchni skóry przez ten szczep już po 2 h od pierwszej aplikacji kremu (Tabela 8). Średni poziom kolonizacji wyniósł $3,0 \pm 0,4$ log CFU/g.

Tabela 8. Wyniki analizy ilościowej i jakościowej dla poszczególnych probantów.

Lp.	Płeć	Wiek	Czas „0” [CFU/g]	Czas 2h od aplikacji [CFU/g]	Czas 2h od aplikacji [log CFU/g]	Zidentyfikowany mikroorganizm
1	W	27	$<1,0 \cdot 10^1$	$6,7 \cdot 10^2$	2,82	<i>Lactobacillus casei</i>
2	M	27	$<1,0 \cdot 10^1$	$8,3 \cdot 10^2$	2,91	<i>Lactobacillus casei</i>
3	M	71	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	<i>Lactobacillus casei</i>
4	W	65	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^3$	3,20	<i>Lactobacillus casei</i>
5	W	71	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	<i>Lactobacillus casei</i>
6	M	63	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	<i>Lactobacillus casei</i>
7	W	41	$<1,0 \cdot 10^1$	$3,9 \cdot 10^2$	2,59	<i>Lactobacillus casei</i>
8	M	43	$<1,0 \cdot 10^1$	$6,5 \cdot 10^3$	3,81	<i>Lactobacillus casei</i>
9	W	42	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^3$	3,00	<i>Lactobacillus casei</i>
10	W	29	$<1,0 \cdot 10^1$	$6,2 \cdot 10^2$	2,79	<i>Lactobacillus casei</i>
11	W	28	$<1,0 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^2$	2,30	<i>Lactobacillus casei</i>
12	M	32	$<1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^3$	3,40	<i>Lactobacillus casei</i>
13	M	30	$<1,0 \cdot 10^1$	$5,9 \cdot 10^2$	2,77	<i>Lactobacillus casei</i>
14	W	28	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^3$	3,26	<i>Lactobacillus casei</i>
15	W	39	$<1,0 \cdot 10^1$	$9,8 \cdot 10^2$	2,99	<i>Lactobacillus casei</i>

Lp.	Płeć	Wiek	Czas „0” [CFU/g]	Czas 2h od aplikacji [CFU/g]	Czas 2h od aplikacji [log CFU/g]	Zidentyfikowany mikroorganizm
16	W	39	$<1,0 \cdot 10^1$	$2,1 \cdot 10^3$	3,32	<i>Lactobacillus casei</i>
17	M	39	$<1,0 \cdot 10^1$	$7,2 \cdot 10^2$	2,86	<i>Lactobacillus casei</i>
18	M	38	$<1,0 \cdot 10^1$	$8,3 \cdot 10^2$	2,91	<i>Lactobacillus casei</i>
19	W	66	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^3$	3,00	<i>Lactobacillus casei</i>
20	M	72	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	<i>Lactobacillus casei</i>
Średnia kolonizacja			$<1,0 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^3$	3,00	<i>Lactobacillus casei</i>

*K- kobieta, M- mężczyzna

Wyniki wskazują na skuteczną kolonizację skóry probantów niezależnie od płci i wieku. Mikrobiom skóry zmienia się wraz z wiekiem, dlatego w przypadku skóry dojrzałej niezwykle ważne jest zapewnienie jej równowagi mikrobiologicznej. Starzenie się wiąże się ze spadkiem różnorodności mikroorganizmów mikrobiomu skóry, co prowadzi do zwiększonej podatności na choroby skóry [15,105].

Kolonizacja skóry probantów bakteriami niezbędnymi do jej prawidłowego funkcjonowania wpływa na przywrócenie równowagi w mikroflorze bakteryjnej skóry pomiędzy bakteriami komensalnymi (korzystnymi) a bakteriami chorobotwórczymi, a tym samym wskazuje na pozytywny wpływ preparatu na mikrobiom skóry. Zapewnienie równowagi mikroflory bakteryjnej skóry przełoży się z kolei na prawidłowe funkcjonowanie bariery skórnej i zmniejszenie stanu zapalnego związanego m.in. z zaburzeniem jej integralności i namnażaniem się bakterii chorobotwórczych. Miejscowe zastosowanie probiotyków jest szczególnie istotne w terapii wspomagającej leczenie AZS, gdzie występuje nasilona kolonizacja bakterią *S. aureus* i utrata różnorodności bakteryjnej na skórze [106]. Leczenie AZS w dużej mierze opiera się na preparatach miejscowych, takich jak kortykosteroidy, czy emolienty. Długotrwałe miejscowe stosowanie kortykosteroidów wiąże się z licznymi działaniami niepożądanymi, w tym zapaleniem mieszków włosowych oraz kontaktowym zapaleniem skóry [106–108]. Dlatego też miejscowe zastosowanie formułacji zawierającej żywe szczepy bakterii probiotycznych, jako preparatu wspomagającego leczenie tej dermatozy, może przynieść pozytywne rezultaty, głównie w zakresie poprawy funkcji bariery skórnej, redukcji świądu i zmniejszenia kolonizacji *Staphylococcus aureus*.

Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że opracowany kosmetyk w formie emulsji O/W, w którym zastosowano mikrosfery alginianowe zawierające żywe bakterie probiotyczne wywiera pozytywny wpływ na mikrobiom skóry człowieka.

9. Podsumowanie przeprowadzonych badań

W ramach pracy doktorskiej opracowano technologię otrzymywania mikrosfer alginianowych, jako nośników bakterii probiotycznych (*Lactobacillus casei* ATCC 393) o potencjalnym zastosowaniu jako składnik aktywny produktów kosmetycznych, przyjaznych dla mikrobiomu skóry.

Najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań to:

- ✓ opracowanie technologii otrzymywania mikrosfer polimerowych opartych na biokompatybilnych i biodegradowalnych surowcach, jakimi są alginiany,
- ✓ otrzymanie stabilnych nośników dla bakterii probiotycznych, o pożądanych właściwościach fizykochemicznych i wysokiej efektywności enkapsulacji,
- ✓ dobór właściwego układu konserwującego do zastosowania w końcowej formulacji, zapewniającego zarówno wysoką przeżywalność mikroorganizmów, jak i stabilność mikrobiologiczną produktu,
- ✓ opracowanie stabilnych kosmetyków probiotycznych w formie oleożelu z nośnikami probiotyków, stanowiących alternatywę dla produktów wymagających konserwacji,
- ✓ potwierdzenie, że zastosowanie kombinacji probiotyków i prebiotyków (produktów symbiotycznych) wpływa w pozytywny sposób na przeżywalność bakterii zamkniętych w nośnikach
- ✓ potwierdzenie, iż zastosowanie dodatkowego powlekania mikrosfer biopolimerami wpływa na zwiększenie hermetyczności nośników,
- ✓ wykazanie na podstawie badań *in vitro* i *in vivo*, że formuacja kosmetyczna zawierająca mikrosfery z probiotykami wpływa pozytywnie na mikrobiom skóry i może być zastosowana jako preparat wspomagający leczenie dermatoz skóry, takich jak AZS.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają, że mikrosfery alginianowe stanowią odpowiednie nośniki dla probiotyków, a opracowane formuacje kosmetyczne są bezpieczne do stosowania na skórę. Ponadto, formuacja zawierająca jako składnik aktywny mikrosfery probiotyczne, wykazuje działanie przeciwbakteryjne i normalizujące mikroflorę skóry.

Zatem główny cel mojej pracy doktorskiej został osiągnięty. Opracowałam formuację zawierającą żywe szczepy bakterii probiotycznych, przyjazną dla mikrobiomu skóry, spełniającą wymagania stawiane produktom kosmetycznym (zgodnie z dyrektywą 1223/2009). Ponadto przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że opracowany produkt może znaleźć zastosowanie nie tylko jako kosmetyk, ale również preparat o właściwościach

proregeneracyjnych, wspomagający leczenie dermatoz skóry, takich jak np. atopowe zapalenie skóry.

10. Spis literary

1. Grice, E.A.; Segre, J.A. The Skin Microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 244–253, doi:10.1038/nrmicro2537.
2. Belkaid, Y.; Segre, J.A. Dialogue between Skin Microbiota and Immunity. *Science* **2014**, *346*, 954–959, doi:10.1126/science.1260144.
3. Erin Chen, Y.; Fischbach, M.A.; Belkaid, Y. Skin Microbiota-Host Interactions. *Nature* **2018**, *553*, 427–436, doi:10.1038/nature25177.
4. Grice, E.A. The Intersection of Microbiome and Host at the Skin Interface: Genomic- and Metagenomic-Based Insights. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1514–1520, doi:10.1101/gr.191320.115.
5. Scharschmidt, T.C.; Fischbach, M.A. What Lives on Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities of the Skin Microbiome. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **2013**, *10*, 1–7, doi:10.1016/j.ddmec.2012.12.003.
6. Butler, É.; Lundqvist, C.; Axelsson, J. Lactobacillus Reuteri DSM 17938 as a Novel Topical Cosmetic Ingredient: A Proof of Concept Clinical Study in Adults with Atopic Dermatitis. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1026, doi:10.3390/microorganisms8071026.
7. Stanford, J.A.; Gallo, R.L. Functions of the Skin Microbiota in Health and Disease. *Semin. Immunol.* **2013**, *25*, 370–377, doi:10.1016/j.smim.2013.09.005.Functions.
8. Paetzold, B.; Willis, J.R.; Pereira De Lima, J.; Knödseder, N.; Brüggemann, H.; Quist, S.R.; Gabaldón, T.; Güell, M. Skin Microbiome Modulation Induced by Probiotic Solutions. *Microbiome* **2019**, *7*, 1–9, doi:10.1186/s40168-019-0709-3.
9. Lee, H.J.; Jeong, S.E.; Lee, S.; Kim, S.; Han, H.; Jeon, C.O. Effects of Cosmetics on the Skin Microbiome of Facial Cheeks with Different Hydration Levels. *Microbiologyopen* **2018**, *7*, e00557, doi:10.1002/mbo3.557.
10. Yan, Y.; Chen, H.; Chen, L.; Cheng, B.; Diao, P.; Dong, L.; Gao, X.; Gu, H.; He, L.; Ji, C.; et al. Consensus of Chinese Experts on Protection of Skin and Mucous Membrane Barrier for Health-Care Workers Fighting against Coronavirus Disease 2019. *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*, e13310, doi:10.1111/dth.13310.
11. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514, doi:10.1038/nrgastro.2014.66.

12. Sfriso, R.; Egert, M.; Gempeler, M.; Voegeli, R.; Campiche, R. Revealing the Secret Life of Skin-with the Microbiome You Never Walk Alone. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 116–126, doi:10.1111/ics.12594.
13. PN-EN ISO 17516:2014-11. Kosmetyki – Mikrobiologia – Limity Mikrobiologiczne.
14. Fernandes, A.; Rodrigues, P.M.; Pintado, M.; Tavaría, F.K. A Systematic Review of Natural Products for Skin Applications: Targeting Inflammation, Wound Healing, and Photo-Aging. *Phytomedicine* **2023**, *115*, 154824, doi:10.1016/j.phymed.2023.154824.
15. Haykal, D.; Cartier, H.; Dréno, B. Dermatological Health in the Light of Skin Microbiome Evolution. *J. Cosmet. Dermatol.* **2024**, *23*, 1–11, doi:10.1111/jocd.16557.
16. Gallo, R.L. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137*, 1213–1214, doi:10.1016/j.jid.2016.11.045.
17. Bustamante, M.; Oomah, B.D.; Oliveira, W.P.; Burgos-Díaz, C.; Rubilar, M.; Shene, C. Probiotics and Prebiotics Potential for the Care of Skin, Female Urogenital Tract, and Respiratory Tract. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2020**, *65*, 245–264, doi:10.1007/s12223-019-00759-3.
18. Holland, K.T.; Bojar, R.A. Cosmetics: What Is Their Influence on the Skin Microflora? *Am. J. Clin. Dermatol.* **2002**, *3*, 445–449, doi:10.2165/00128071-200203070-00001.
19. Dréno, B.; Araviiskaia, E.; Berardesca, E.; Gontijo, G.; Sanchez Viera, M.; Xiang, L.F.; Martin, R.; Bieber, T. Microbiome in Healthy Skin, Update for Dermatologists. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2016**, *30*, 2038–2047, doi:10.1111/jdv.13965.
20. Singh, P.; Teal, T.K.; Marsh, T.L.; Tiedje, J.M.; Mosci, R.; Jernigan, K.; Zell, A.; Newton, D.W.; Salimnia, H.; Lephart, P.; et al. Intestinal Microbial Communities Associated with Acute Enteric Infections and Disease Recovery. *Microbiome* **2015**, *3*, 1–12, doi:10.1186/s40168-015-0109-2.
21. Chen, Y.E.; Tsao, H. The Skin Microbiome: Current Perspectives and Future Challenges. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *69*, 143–155, doi:10.1016/j.jaad.2013.01.016.
22. Ellis, S.R.; Nguyen, M.; Vaughn, A.R.; Notay, M.; Burney, W.A.; Sandhu, S.; Sivamani, R.K. The Skin and Gut Microbiome and Its Role in Common Dermatologic Conditions. *Microorganisms* **2019**, *7*, 550, doi:10.3390/microorganisms7110550.
23. Skowron, K.; Bauza-Kaszewska, J.; Kraszewska, Z.; Wiktorczyk-Kapischke, N.; Grudlewska-Buda, K.; Kwiecińska-Piróg, J.; Walecka-Zacharska, E.; Radtke, L.; Gospodarek-Komkowska, E. Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms* **2021**, *9*, 543, doi:10.3390/microorganisms9030543.

24. Salem, I.; Ramser, A.; Isham, N.; Ghannoum, M.A. The Gut Microbiome as a Major Regulator of the Gut-Skin Axis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1459, doi:10.3389/fmicb.2018.01459.
25. Lopes, E.G.; Moreira, D.A.; Gullón, P.; Gullón, B.; Cardelle-Cobas, A.; Tavaría, F.K. Topical Application of Probiotics in Skin: Adhesion, Antimicrobial and Antibiofilm in Vitro Assays. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 450–461, doi:10.1111/jam.13349.
26. Prescott, S.L.; Larcombe, D.; Logan, A.C.; West, C.; Burks, W.; Caraballo, L.; Levin, M.; Etten, E. Van; Horwitz, P.; Kozyrskyj, A.; et al. The Skin Microbiome: Impact of Modern Environments on Skin Ecology, Barrier Integrity, and Systemic Immune Programming. *World Allergy Organ. J.* **2017**, *10*, 1–16, doi:10.1186/s40413-017-0160-5.
27. Domenico, E.G. Di; Cavallo, I.; Capitanio, B.; Ascenzioni, F.; Pimpinelli, F.; Morrone, A.; Ensoli, F. Staphylococcus Aureus and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Microorganisms* **2019**, *7*, 301, doi:10.3390/microorganisms7090301.
28. Hyseni, E.; Glavas Dodov, M. Probiotics in Dermatological and Cosmetic Products – Application and Efficiency. *Maced. Pharm. Bull.* **2022**, *68*, 9–26, doi:10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.01.002.
29. Dou, J.; Feng, N.; Guo, F.; Chen, Z.; Liang, J.; Wang, T.; Guo, X.; Xu, Z. Applications of Probiotic Constituents in Cosmetics. *Molecules* **2023**, *28*, 6765, doi:10.3390/molecules28196765.
30. Knackstedt, R.; Knackstedt, T.; Gatherwright, J. The Role of Topical Probiotics on Wound Healing: A Review of Animal and Human Studies. *Int. Wound J.* **2020**, *17*, 1687–1694, doi:10.1111/iwj.13451.
31. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
32. Lamberte, L.E.; van Schaik, W. Antibiotic Resistance in the Commensal Human Gut Microbiota. *Curr. Opin. Microbiol.* **2022**, *68*, 102150, doi:10.1016/j.mib.2022.102150.
33. Montassier, E.; Valdés-Mas, R.; Batard, E.; Zmora, N.; Dori-Bachash, M.; Suez, J.; Elinav, E. Probiotics Impact the Antibiotic Resistance Gene Reservoir along the Human GI Tract in a Person-Specific and Antibiotic-Dependent Manner. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 1043–1054, doi:10.1038/s41564-021-00920-0.
34. Bai, X.; Zhu, M.; He, Y.; Wang, T.; Tian, D.; Shu, J. The Impacts of Probiotics in

- Eradication Therapy of *Helicobacter Pylori*. *Arch. Microbiol.* **2022**, *204*, 692, doi:10.1007/s00203-022-03314-w.
35. Puebla-Barragan, S.; Reid, G. Probiotics in Cosmetic and Personal Care Products : Trends and Challenges. *Molecules* **2021**, *26*, 1249, doi:10.3390/molecules26051249.
 36. Vinderola, G.; Sanders, M.E.; Salminen, S. The Concept of Postbiotics. *Foods* **2022**, *11*, 1077, doi:10.3390/foods11081077.
 37. Ouwehand, A.C.; Lahtinen, S.; Tiihonen, K. The Potential of Probiotics and Prebiotics for Skin Health. *Textb. Aging Ski.* **2017**, 1299–1313, doi:10.1007/978-3-662-47398-6_77.
 38. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502, doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
 39. Ministry of Environment and Food of Denmark *Survey of Cosmetic Products with “Probiotic” or “Prebiotic” Claims*; Warming, M., Lassen, C., Christensen, F., Eds.; The Danish Environmental Protection Agency, 2016; ISBN 9788770380034.
 40. Clifford, M.N. Diet-Derived Phenols in Plasma and Tissues and Their Implications for Health. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1103–1114, doi:10.1055/s-2004-835835.
 41. Dueñas, M.; Muñoz-González, I.; Cueva, C.; Jiménez-Girón, A.; Sánchez-Patán, F.; Santos-Buelga, C.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 850902, doi:10.1155/2015/850902.
 42. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 649–667, doi:10.1038/s41575-021-00440-6.
 43. Aguilar-Toalá, J.E.; Garcia-Varela, R.; Garcia, H.S.; Mata-Haro, V.; González-Córdova, A.F.; Vallejo-Cordoba, B.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An Evolving Term within the Functional Foods Field. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 105–114, doi:10.1016/j.tifs.2018.03.009.
 44. Koleilat, A. Beyond Probiotics the Postbiotics. *Gastroenterol. Hepatol. Open Access* **2019**, *10*, 324–326, doi:10.15406/ghoa.2019.10.00404.

45. Majeed, M.; Majeed, S.; Nagabhushanam, K.; Mundkur, L.; Rajalakshmi, H.R.; Shah, K.; Beede, K. Novel Topical Application of a Postbiotic, Lactosporin®, in Mild to Moderate Acne: A Randomized, Comparative Clinical Study to Evaluate Its Efficacy, Tolerability and Safety. *Cosmetics* **2020**, *7*, 70, doi:10.3390/COSMETICS7030070.
46. Zolkiewicz, J.; Marzec, A.; Ruszczynski, M.; Feleszko, W. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* **2020**, *12*, 2189, doi:10.3390/nu12082189.
47. Kim, J.Y.; Park, B.K.; Park, H.J.; Park, Y.H.; Kim, B.O.; Pyo, S. Atopic Dermatitis-Mitigating Effects of New Lactobacillus Strain, Lactobacillus Sakei Probio 65 Isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 517–526, doi:10.1111/jam.12229.
48. Guéniche, A.; Bastien, P.; Ovigne, J.M.; Kermici, M.; Courchay, G.; Chevalier, V.; Breton, L.; Castiel-Higounenc, I. Bifidobacterium Longum Lysate , a New Ingredient for Reactive Skin. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 1–8, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00932.x.
49. Szöllősi, A.G.; Gueniche, A.; Jammayrac, O.; Szabó-Papp, J.; Blanchard, C.; Vasas, N.; Andrási, M.; Juhász, I.; Breton, L.; Bíró, T. Bifidobacterium Longum Extract Exerts Pro-differentiating Effects on Human Epidermal Keratinocytes, in Vitro. *Exp. Dermatol.* **2017**, *26*, 92–94, doi:10.1111/exd.13130.
50. Jung, Y.-O.; Jeong, H.; Cho, Y.; Lee, E.-O.; Jang, H.-W.; Kim, J.; Nam, K.T.; Lim, K.-M. Lysates of a Probiotic, Lactobacillus Rhamnosus, Can Improve Skin Barrier Function in a Reconstructed Human Epidermis Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4289, doi:10.3390/ijms20174289.
51. Khmaladze, I.; Butler, É.; Fabre, S.; Gillbro, J.M. Lactobacillus Reuteri DSM 17938 — A Comparative Study on the Effect of Probiotics and Lysates on Human Skin. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 822–828, doi:10.1111/exd.13950.
52. Patra, V.; Sérézal, I.G.; Wolf, P. Potential of Skin Microbiome, pro-and/or Pre-Biotics to Affect Local Cutaneous Responses to UV Exposure. *Nutrients* **2020**, *12*, 1795, doi:10.3390/nu12061795.
53. Rong, J.; Shan, C.; Liu, S.; Zheng, H.; Liu, C.; Liu, M.; Jin, F.; Wang, L. Skin Resistance to UVB-Induced Oxidative Stress and Hyperpigmentation by the Topical Use of Lactobacillus Helveticus NS8-Fermented Milk Supernatant. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 511–523, doi:10.1111/jam.13506.
54. Adams, C.A. The Probiotic Paradox: Live and Dead Cells Are Biological Response Modifiers. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 37–46, doi:10.1017/S0954422410000090.
55. Park, S.B.; Im, M.; Lee, Y.; Lee, J.H.; Lim, J.; Park, Y.H.; Seo, Y.J. Effect of Emollients

- Containing Vegetable-Derived *Lactobacillus* in the Treatment of Atopic Dermatitis Symptoms: Split-Body Clinical Trial. *Ann. Dermatol.* **2014**, *26*, 150–155, doi:10.5021/ad.2014.26.2.150.
56. Luoto, R.; Ruuskanen, O.; Waris, M.; Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Isolauri, E. Prebiotic and Probiotic Supplementation Prevents Rhinovirus Infections in Preterm Infants: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 405–413, doi:10.1016/j.jaci.2013.08.020.
 57. Wu, K.G.; Li, T.H.; Peng, H.J. *Lactobacillus Salivarius* plus Fructo-Oligosaccharide Is Superior to Fructo-Oligosaccharide Alone for Treating Children with Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Double-Blind, Randomized, Clinical Trial of Efficacy and Safety. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *166*, 129–136, doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10596.x.
 58. Notay, M.; Saric-Bosanac, S.; Vaughn, A.R.; Dhaliwal, S.; Trivedi, M.; Reiter, P.N.; Rybak, I.; Li, C.C.; Weiss, L.B.; Ambrogio, L.; et al. The Use of Topical *Nitrosomonas Eutropha* for Cosmetic Improvement of Facial Wrinkles. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 689–693, doi:10.1111/jocd.13060.
 59. Peral, M.C.; Rachid, M.M.; Gobbato, N.M.; Huaman Martinez, M.A.; Valdez, J.C. Interleukin-8 Production by Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Chronic Infected Leg Ulcers Treated with *Lactobacillus Plantarum*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 281–286, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x.
 60. Campos, E.; Branquinho, J.; Carreira, A.S.; Carvalho, A.; Coimbra, P.; Ferreira, P.; Gil, M.H. Designing Polymeric Microparticles for Biomedical and Industrial Applications. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2005–2021, doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.04.033.
 61. Vilos, C.; Velasquez, L.A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–9, doi:10.1155/2012/672760.
 62. Solanki, H.K.; Pawar, D.D.; Shah, D.A.; Prajapati, V.D.; Jani, G.K.; Mulla, A.M.; Thakar, P.M. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–21, doi:10.1155/2013/620719.
 63. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A.J.; Antal, I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Sci. Pharm.* **2019**, *87*, 20, doi:10.3390/scipharm87030020.
 64. Coelho, J.F.; Ferreira, P.C.; Alves, P.; Cordeiro, R.; Fonseca, A.C.; Góis, J.R.; Gil, M.H. Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments. *EPMA J.* **2010**, *1*, 164–209, doi:10.1007/s13167-010-0001-x.

65. Matricardi, P.; Di Meo, C.; Coviello, T.; Alhaique, F. Recent Advances and Perspectives on Coated Alginate Microspheres for Modified Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 417–425, doi:10.1517/17425247.5.4.417.
66. Teoh, P.L.; Mirhosseini, H.; Mustafa, S.; Hussin, A.S.M.; Manap, M.Y.A. Recent Approaches in the Development of Encapsulated Delivery Systems for Probiotics. *Food Biotechnol.* **2011**, *25*, 77–101, doi:10.1080/08905436.2011.547332.
67. Tønnesen, H.H.; Karlsen, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 621–630, doi:10.1081/DDC-120003853.
68. Gomathi, T.; Susi, S.; Abirami, D.; Sudha, P.N. Size Optimization And Thermal Studies On Calcium Alginate Nanoparticles. *IOSR J. Pharm.* **2017**, *48*, 1–7.
69. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S.V. Technology and Potential Applications of Probiotic Encapsulation in Fermented Milk Products. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4679–4696, doi:10.1007/s13197-014-1516-2.
70. Van Vlierberghe, S.; Graulus, G.J.; Samal, S.K.; Van Nieuwenhove, I.; Dubruel, P. Porous Hydrogel Biomedical Foam Scaffolds for Tissue Repair. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*; Woodhead Publishing Limited, 2014; pp. 335–390 ISBN 9780857096968.
71. Wyłębska, Ł.; Szuster, L.; Stawska, H. Synteza i Aplikacja Nowych Pochodnych Wybranych Polisacharydów Część I: Przegląd Literatury. *Technol. i Jakość Wyr.* **2014**, *59*, 3–16.
72. Asgari, S.; Pourjavadi, A.; Licht, T.R.; Boisen, A.; Ajalloueian, F. Polymeric Carriers for Enhanced Delivery of Probiotics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *161*, 1–21, doi:10.1016/j.addr.2020.07.014.
73. Khalil, S.; Sun, W. Deposition and Structural Formation of 3D Alginate Tissue Scaffolds, Drexel University: Philadelphia, 2005.
74. Walczak, J.; Marchewka, J.; Laska, J. Hydrożele Alginianowe Sieciowane Jonowo i Kowalencyjnie. *Eng. Biomater.* **2015**, *18*, 17–23.
75. Paques, J.P. Formation of Alginate Nanospheres, Wageningen University, 2014.
76. Kim, S.; Jeong, C.; Cho, S.; Kim, S.B. Effects of Thermal Treatment on the Physical Properties of Edible Calcium Alginate Gel Beads: Response Surface Methodological Approach. *Foods* **2019**, *8*, 578, doi:10.3390/foods8110578.
77. Jarmoluk, A.; Wrzeszcz, K.; Zimoch, A.; Marycz, K. Sieciowanie Alginianu Sodu Do Hydrożeli Dla Inżynierii Tkankowej. *Przem. Chem.* **2013**, *92*, 1018–1022.
78. Gombotz, W.R.; Wee, S.F. Protein Release from Alginate Matrices. *Adv. Drug Deliv.*

- Rev.* **2012**, 64, 194–205, doi:10.1016/j.addr.2012.09.007.
79. Cook, M.T.; Tzortzis, G.; Charalampopoulos, D.; Khutoryanskiy, V. V. Microencapsulation of Probiotics for Gastrointestinal Delivery. *J. Control. Release* **2012**, 162, 56–67, doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
 80. Emmerichs, N.; Wingender, J.; Flemming, H.C.; Mayer, C. Interaction between Alginates and Manganese Cations: Identification of Preferred Cation Binding Sites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, 34, 73–79, doi:10.1016/j.ijbiomac.2004.03.004.
 81. King, A.H. Encapsulation of Food Ingredients A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. *Encapsulation Control. Release Food Ingredients ACS Symp. Ser.* **1995**, 26–39, doi:10.1021/bk-1995-0590.ch003.
 82. Gbassi, G.K.; Vandamme, T. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics* **2012**, 4, 149–163, doi:10.3390/pharmaceutics4010149.
 83. Martín, M.J.; Lara-Villoslada, F.; Ruiz, M.A.; Morales, M.E. Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, 27, 15–25, doi:10.1016/j.ifset.2014.09.010.
 84. Heidebach, T.; Först, P.; Kulozik, U. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, 52, 291–311, doi:10.1080/10408398.2010.499801.
 85. Gouin, S. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 330–347, doi:10.1016/j.tifs.2003.10.005.
 86. Kailasapathy, K. Encapsulation Technologies for Functional Foods and Nutraceutical Product Development. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **2009**, 4, 1–19, doi:10.1079/PAVSNNR20094033.
 87. de Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components. *Int. Dairy J.* **2010**, 20, 292–302, doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008.
 88. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *Int. Dairy J.* **2003**, 13, 3–13, doi:10.1016/S0958-6946(02)00155-3.
 89. Groboillot, A.F.; Champagne, C.P.; Darling, G.D.; Poncelet, D.; Neufeld, R.J. Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus Lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 1157–1163, doi:10.1002/bit.260421005.

90. Shima, M.; Morita, Y.; Yamashita, M.; Adachi, S. Protection of *Lactobacillus Acidophilus* from the Low pH of a Model Gastric Juice by Incorporation in a W/O/W Emulsion. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 1164–1169, doi:10.1016/j.foodhyd.2006.01.001.
91. Mortazavian, A.M.; Ehsani, M.R.; Azizi, A.; Razavi, S.H.; Mousavi, S.M.; Sohrabvandi, S.; Reinheimer, J.A. Viability of Calcium-Alginate-Microencapsulated Probiotic Bacteria in Iranian Yogurt Drink (Doogh) during Refrigerated Storage and under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Aust. J. Dairy Technol.* **2008**, *63*, 24–29.
92. Mortazavian, A.; Razavi, S.H.; Ehsani, M.R.; Sohrabvandi, S. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. *Iran. J. Biotechnol.* **2007**, *5*, 1–18.
93. Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Peiris, P.; Kailasapathy, K. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *62*, 47–55, doi:10.1016/S0168-1605(00)00380-9.
94. Ji, R.; Wu, J.; Zhang, J.; Wang, T.; Zhang, X.; Shao, L.; Chen, D.; Wang, J. Extending Viability of *Bifidobacterium Longumin* Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Using Emulsification and Internal Gelation Encapsulation Technology. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1389, doi:10.3389/fmicb.2019.01389.
95. Prabhurajeshwar, C.; Chandrakanth, K. Evaluation of Antimicrobial Properties and Their Substances against Pathogenic Bacteria In-Vitro by Probiotic *Lactobacilli* Strains Isolated from Commercial Yoghurt. *Clin. Nutr. Exp.* **2019**, *23*, 97–115, doi:10.1016/j.clnex.2018.10.001.
96. Chen, C.C.; Lai, C.C.; Huang, H.L.; Su, Y.T.; Chiu, Y.H.; Toh, H.S.; Chiang, S.R.; Chuang, Y.C.; Lu, Y.C.; Tang, H.J. Antimicrobial Ability and Mechanism Analysis of *Lactobacillus* Species against Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2021**, *54*, 447–456, doi:10.1016/j.jmii.2020.01.005.
97. Kazemipoor, M.; Radzi, C.W.J.W.M.; Begum, K.; Yaze, I. Screening of Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Vegetables against Food Borne Pathogens. *Arch. des Sci.* **2012**, *65*, 192–201.
98. PN-EN ISO 22718:2016-01. Kosmetyki- Mikrobiologia- Wykrywanie Obecności *Staphylococcus Aureus*.
99. PN-EN ISO 22717:2016-01. Kosmetyki- Mikrobiologia- Wykrywanie Obecności *Pseudomonas Aeruginosa*.
100. PN-EN ISO 21150:2016-01. Kosmetyki- Mikrobiologia- Wykrywanie Obecności *Escherichia Coli*.

101. PN-EN ISO 18416:2016-01. Kosmetyki- Mikrobiologia- Wykrywanie Obecności *Candida Albicans*.
102. PN-EN ISO 21149:2017-07. Kosmetyki- Mikrobiologia- Zliczanie i Wykrywanie Mezofilnych Bakterii Tlenowych.
103. Jałosińska, M. Przeżywalność Szczepu *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 w Probiotycznym i Synbiotycznym Bananowo-Mlecznym Napoju Fermentowanym Podczas Przechowywania. *Żywność Nauk. Technol. Jakość* **2015**, 22, 64–73, doi:10.15193/zntj/2015/100/040.
104. Miastkowska, M.; Kulawik-Pióro, A.; Lasoń, E.; Śliwa, K.; Malinowska, M.A.; Sikora, E.; Kantyka, T.; Bielecka, E.; Maksylewicz, A.; Klimaszewska, E.; et al. Topical Formulations Based on Ursolic Acid-Loaded Nanoemulgel with Potential Application in Psoriasis Treatment. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2559, doi:10.3390/pharmaceutics15112559.
105. Ratanapokasatit, Y.; Laisuan, W.; Rattananukrom, T.; Petchlorlian, A.; Thaipsisuttikul, I.; Sompornrattanaphan, M. How Microbiomes Affect Skin Aging: The Updated Evidence and Current Perspectives. *Life* **2022**, 12, 936, doi:10.3390/life12070936.
106. Hrestak, D.; Matijašić, M.; Paljetak, H.Č.; Drvar, D.L.; Hadžavdić, S.L.; Perić, M. Skin Microbiota in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 3503, doi:10.3390/ijms23073503.
107. Luger, T.; Amagai, M.; Dreno, B.; Dagnelie, M.A.; Liao, W.; Kabashima, K.; Schikowski, T.; Proksch, E.; Elias, P.M.; Simon, M.; et al. Atopic Dermatitis: Role of the Skin Barrier, Environment, Microbiome, and Therapeutic Agents. *J. Dermatol. Sci.* **2021**, 102, 142–157, doi:10.1016/j.jdermsci.2021.04.007.
108. Frankel, D.; Lio, P. The Role of Topical Probiotics for Atopic Dermatitis : A Systematic Review. *J. Integr. Dermatology* **2023**, 1–10.

11. Zestawienie osiągnięć naukowych

Publikacje naukowe (*- autor do korespondencyjny, IF- Impact Factor, MNiSW – punktacja ministerialna czasopisma):

1. **Łętocha A.***, Rachwalik R., *Analysis of selected allergens present on alcohol-based perfumes*, Current Chemistry Letters, 2021, 10, 435-444. MNiSW: 40
2. **Łętocha A.***, Sikora E., *Pre- and probiotics as raw materials for cosmetic products*, EYEC Monograph 2021, Warszawa, 2021, 47-51. MNiSW: 20
3. Ryś M., Miastkowska M., Sikora E., **Łętocha A.**, Krajewska A, Synowiec A.*, *Bio-herbicidal potential of nanoemulsions with peppermint oil on barnyard grass and maize*, Molecules, 2022, 27(11), 3480. IF: 4,2; MNiSW: 140
4. **Łętocha A.***, Miastkowska M., Sikora E., *Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications*, Polymers, 2022, 14, 3834. IF: 4,7; MNiSW: 100
5. **Łętocha A.***, Miastkowska M., Sikora E., *Probiotyczne surowce, jako składniki aktywne formułacji kosmetycznych*, Przemysł Chemiczny, 2022, 101/9. IF: 0,5; MNiSW: 70
6. Miastkowska M.*, **Łętocha A.**, Michalczyk A., *Statistical methods of data analysis in obtaining thyme oil-loaded nanoemulsions as potential skin antiseptic*, Chemical and Process Engineering: New Frontiers, 2023, 44(4), e36. IF: 0,5; MNiSW: 100
7. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier*, Chemical and Process Engineering: New Frontiers, 2023, 44(3), e20. IF: 0,5; MNiSW: 100
8. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E.*, *Probiotics-Loaded Microspheres for Cosmetic Applications*, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183. IF: 2,5; MNiSW: 100
9. Ryś M., Miastkowska M., **Łętocha A.**, Wajs-Bonikowska A., Lorenzo P., Synowiec A.*, *The effect of caraway oil-loaded bio-nanoemulsions on the growth and performance of barnyard grass and maize*, Scientific Reports, 2024, 14(1), 4313. IF: 3,8; MNiSW: 140
10. Bialik-Wąs K.*, Kulawik-Pióro A., Sienkiewicz A., **Łętocha A.**, Osińska J., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Barczewski M., Lanoue A., Giglioli-Guivarc'h N., Miastkowska M., *Design and development of multibiocomponent hybrid alginate hydrogels and lipid nanodispersion as new materials for medical and cosmetic applications*, International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 134405. IF: 7,7; MNiSW: 100

11. **Łętocha A.***, Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., Effect of Encapsulation of Lactobacillus casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria, ACS Applied Materials&Interfaces, 2024, 16(39), 52878-52893. IF: 8,5; MNiSW: 200
12. **Łętocha A.***, Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, Molecules, 2024, 29, 5984. IF: 4,2; MNiSW: 140

Patenty i zgłoszenia patentowe:

1. Patent o numerze PL 246674, „Sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne”, 2025.
2. Zgłoszenie patentowe o numerze P. 445990, „Formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne”, 2023.
3. Zgłoszenie patentowe o numerze P.451982, „Formulacja probiotyczna w postaci dyspersji mikrokapsulek probiotycznych”
4. Zgłoszenie patentowe o numerze P.451983, „Mikrokapsułki probiotyczne”
5. Zgłoszenie patentowe o numerze P.451984, „Sposób otrzymywania formulacji probiotycznej w postaci dyspersji mikrokapsulek probiotycznych”
6. Zgłoszenie patentowe o numerze P.451985, „Sposób otrzymywania mikrokapsulek probiotycznych”

Konferencje naukowe:

1. Łętocha A., Sikora E., *Formulacje kosmetyczne a mikrobiom skóry*, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Nowe Trendy w Badaniach Naukowych, Kraków, 26-28.02.2021, komunikat ustny, konferencja online
2. Łętocha A., Sikora E., Pre- and probiotics as raw materials for cosmetic products, 9th European Young Engineers Conference,, Politechnika Warszawska, Warszawa, 19-21.04.2021, prezentacja posterowa, konferencja online
3. Łętocha A., Sikora E., Study of antioxidant properties of selected cosmetic pre-and probiotics, II Międzynarodowa Konferencja „Chemistry for beauty and health”, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, 12-14.05.2021, prezentacja posterowa, konferencja online
4. Łętocha A., Sikora E., Opracowanie i badanie właściwości formulacji kosmetycznych zawierających probiotyki, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Nowe

- Wyzwania dla Polskiej Nauki, Gdańsk, 2-5.09.2021, prezentacja ustna, konferencja hybrydowa, udział zdalnie oraz stacjonarnie, wystąpienie otrzymało wyróżnienie
5. Łętocha A., Sikora E., Pre- i probiotyki, jako składniki aktywne kosmetyków do mycia, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników - Wystąpienia Młodego Naukowca - Edycja IV, Kraków, 5-6.03.2022, prezentacja ustna, konferencja online
 6. Łętocha A., Sikora E., Mikrosfery alginianowe, jako nośnik substancji aktywnych, XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2022 pt. „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, Lublin, 24-27.03.2022, prezentacja ustna, konferencja online
 7. Łętocha A., Sikora E., Probiotics as active ingredients of care and cleansing cosmetic formulations, 10 th European Young Engineers Conference, Politechnika Warszawska, Warszawa, 4-6.04. 2022, prezentacja posterowa, konferencja online
 8. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., Wpływ składników probiotycznych na właściwości kosmetyków, X Kongres Technologii Chemicznej, Wrocław, 11-14.05.2022, Wrocław, prezentacja ustna, konferencja stacjonarna
 9. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Mikrosfery alginianowe- charakterystyka, przygotowanie i zastosowanie*, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców pt. Biologia, Chemia i Środowisko, Edycja III, 20-22.05.2022, prezentacja ustna, konferencja online
 10. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Cosmetic formulations based on probiotic raw materials*, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców pt. Biologia, Chemia i Środowisko, Edycja III, 20-22.05.2022, prezentacja posterowa, konferencja online
 11. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Opracowanie i badanie właściwości preparatów kosmetycznych zawierających produkty fermentacji bakteryjnej*, VI Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS, 24.06.2022, prezentacja ustna, konferencja online
 12. Osińska J., Łętocha A., Miastkowska M., *Opracowanie receptur nanonośników sylimaryny na bazie olejów roślinnych bogatych w GLA*, Sesja Studenckich Kół Naukowych, 25.05.2022, prezentacja ustna
 13. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Optymalizacja procesu otrzymywania mikrokapsulek alginianowych*, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Nowe Wyzwania dla Polskiej Nauki, Katowice, 2-8.09.2022, prezentacja ustna, konferencja hybrydowa, udział zdalnie oraz stacjonarnie, wyróżnienie

14. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Metody statystyczne w ocenie mikrokapsulek alginianowych*, VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biopolimery – źródła nowych materiałów”, 27.10.2022, prezentacja ustna, konferencja online
15. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Mikrokapsułki alginianowe, jako nośniki substancji aktywnych o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle kosmetycznym*, Biomateriały w medycynie i kosmetologii, Toruń, 22.02.2023, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna
16. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Optimization of obtaining alginate microparticles*, 11th European Young Engineers Conference (EYEC), Warszawa, 17-19.04.2023, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna
17. Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., *Projektowanie formulacji mikrosfer alginianowych za pomocą matematycznych metod planowania eksperymentu*, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Inżynieria – Spojrzenie Młodych Naukowców – Edycja II, 20-21.05.2023, prezentacja ustna, konferencja online, wystąpienie wyróżnione
18. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Formulation and statistical optimization of alginate microspheres for probiotic encapsulation*, 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering, Szczecin, 13-16.06.2023, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna
19. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Mikrosfery alginianowe z probiotykiem L. casei – zastosowanie w agrochemii*, XLVII Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne „Chemistry for Agriculture”, Karpacz, 26-29.11.2023, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna
20. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Alginate microspheres with probiotics – application in the cosmetics*, Life Science Open Space, Kraków, 30.11.-01.12.2023, prezentacja ustna, konferencja stacjonarna
21. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Probiotic microspheres as a component of the skin care products*, V Sympozjum Biomateriały w medycynie i kosmetologii, Toruń, 28.02.2024, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna
22. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Biodegradowalne mikrosfery alginianowo – tapiokowe, jako nośniki probiotyków*, Zrównoważony rozwój w obszarze kosmetyków i detergentów, Kędzierzyn-Koźle, 11-12.04.2024, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna, wystąpienie wyróżnione (2 miejsce)

23. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., Symbiotic microspheres for cosmetic application, 3rd International Conference on Chemistry for beauty and health, Kraków, 13-15.06.2024, prezentacja posterowa, konferencja stacjonarna, wystąpienie wyróżnione (1 miejsce)
24. Łętocha A., Michalczyk A., Miastkowska M., Sikora E., *Powlekane biopolimerami mikrosfery alginianowo-tapiokowe, jako nośnik substancji aktywnych*, 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem 2024 i XI Kongres Technologii Chemicznej, Poznań, 15-20 września 2024, konferencja stacjonarna, wystąpienie ustne

Stáže naukowe:

1. Staż w Pracowni Procesów Biotechnologicznych, Sieć Badawcza Łukasiewicz, Warszawa (02.2024-03.2024)
2. Staż w Zespole Proteolizy i Modyfikacji Potranslacyjnej Białek, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Kraków (05.2023-02.2024)
3. Staż w Pracowni Procesów Biotechnologicznych, Sieć Badawcza Łukasiewicz, Warszawa (01.2023-02.2023)

Projekty naukowe:

1. „Optymalizacja procesu tworzenia mikrokapsulek alginianowych”, DS – M Politechnika Krakowska w ramach subwencji MEiN na rozwój potencjału badawczego uczelni, rola w projekcie: kierownik tematu, umowa z PK – C-07/31/1015/2022/DS-M
2. „Opracowanie mikrokapsulek alginianowych zawierających bakterie probiotyczne”, DS – M Politechnika Krakowska w ramach subwencji MEiN na rozwój potencjału badawczego uczelni, rola w projekcie: kierownik tematu, umowa z PK - C-09/31/734/2023
3. „Opracowanie technologii pozyskiwania ekstraktu z kory brzozy z wykorzystaniem ultradźwięków oraz opracowanie receptur ekokosmetyków na bazie produktów pszczelich i betuliny”, realizowany na zlecenie firmy „INSYGNIA”, Sławomir Bochenek, rola w projekcie: wykonawca, umowa z PK – C2/382/2021/P
4. „Opracowanie dla MARMED HEALTH CARE Sp. z o.o. serii preparatów na bazie fosfolipidów biomimetycznych, przeznaczonych dla pacjentów stomijnych”, we współpracy z firmą Marmed Health Care Sp. Z o.o.; RPMP.01. 02.03-12- 0280/21/2020-2021, rola w projekcie: wykonawca, umowa z PK - C-2/253/2022/P

5. umowa PK C-2/133/2023/P we współpracy z Zakładem Farmaceutycznym Amara sp. zoo. (objęta poufnością)

Wyjazdy szkoleniowe:

1. BIP "MedChem Program: From Organic Chemistry to Pharmaceutical Drugs, Porto, 15-24 July, 2024

Studia podyplomowe:

1. Mikrobiologia, Higiena, Środowisko – Uniwersytet Warszawski, 01/2023 – 12/2023
2. Jakość i bezpieczeństwo produktów kosmetycznych – Uniwersytet Łódzki, 03/2021 – 02/2022

Pozostałe:

1. 14 edycja Małopolskiej Nocy Naukowców – zaangażowanie i wkład w organizację wydarzenia, 27 listopada 2020r.
2. „Małopolska Chmura Edukacyjna- nowy model nauczania” – czynny udział w projekcie, warsztaty weekendowe
3. Koło Naukowe „CosMed – technologia kosmetyków, wyrobów medycznych i podłoży farmaceutycznych” – czynny udział w działalności koła naukowego
4. 16 edycja Małopolskiej Nocy Naukowców – pomysłodawca i organizator wybranych wydarzeń, 30 września 2022r.
5. Life Science Open Space – Collaboration and Innovation Summit for Health and Quality of Life – 30 listopada – 1 grudnia 2023r.
6. Dzień Chemika – pomysłodawca i organizator wybranych pokazów, 14 maja 2024r.
7. Dzień Wynalazków PK 2024 – 16 maja 2024r.
8. Women in Tech – prezentacja działalności Koła Naukowego
9. Członek Komitetu Organizacyjnego 3rd International Conference on Chemistry for beauty and health, Kraków, 13-15.06.2024
10. 18 edycja Małopolskiej Nocy Naukowców – pomysłodawca i organizator wybranych wydarzeń, 28 września 2024r.
11. Dzień Wynalazków PK 2025 – 8 maja 2025r.
12. Członek Komitetu Organizacyjnego konferencji “Fitoforum 2025” Koryciny, 23-25.05.2025

12. STRESZCZENIE

- Ze względu na liczne korzyści zdrowotne bakterii probiotycznych istnieje ogromne zapotrzebowanie na produkty je zawierające, które są wykorzystywane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym do regulacji mikrobiomu jelitowego i walki z opornością na antybiotyki. W przypadku przemysłu kosmetycznego wyzwaniem pozostaje spełnienie wymagań dotyczących składu kosmetyków, przy jednoczesnym zachowaniu żywych komórek bakterii w potencjalnych formułacjach probiotycznych. Jednym z obiecujących rozwiązań zwiększających przeżywalność probiotyków jest ich mikrokapsułkowanie.

- Celem pracy było opracowanie formułacji kosmetycznej, pozwalającej na skuteczne wprowadzenie żywych bakterii probiotycznych przy zachowaniu wymogów stawianych produktom kosmetycznym. W związku z tym konieczne było opracowanie technologii mikrokapsułkowania, która umożliwiłaby enkapsulację mikroorganizmów probiotycznych z wysoką wydajnością kapsułkowania oraz przeżywalnością w czasie.

- Pierwszym etapem badań było poszukiwanie efektywnej formy, nośnika dla żywych szczepów probiotycznych oraz optymalizacja składu kompozycji nośnikowej. W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskano profile aproksymacji, które pozwoliły określić optymalne parametry procesu. Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano stabilne mikrosfery alginianowe o rozmiarach od 10 do 30 mikrometrów. Obserwacji kształtu i rozmiaru mikrosfer dokonano za pomocą mikroskopu optycznego. Natomiast morfologię otrzymanych nośników obserwowano za pomocą SEM i TEM. Na podstawie uzyskanej optymalizacji do dalszych badań oraz do części mikrobiologicznej przygotowano próbki – stabilnej mikrodyspersji oraz mikrosfer dla parametrów: stężenie chlorku wapnia (środka sieciującego) równe $0,3 \text{ mol/dm}^3$, szybkość wkraplania CaCl_2 na poziomie 10 kropli na minutę i amplituda procesu ultrasonifikacji 69%. Sprawdzono EE przy stosowaniu różnych prędkości wirowania (brak wirowania, 500 rpm oraz 30 000 rpm).

- Następnie zawiesinę szczepu probiotycznego oraz uzyskane z niej mikrosfery poddano działaniu różnych czynników fizykochemicznych takich jak: temperatura, promieniowanie UV, odczyn pH oraz działaniu środka konserwującego. Oceny żywotności komórek probiotycznych wolnych i zakapsułkowanych dokonano poprzez zliczanie kolonii bakteryjnych wyrosłych na płytkach z agarowym podłożem MRS po użyciu techniki inokulacji pour plate. Uzyskane wyniki wykazały, iż nośnik w postaci mikrosfer alginianowych wpływał pozytywnie na żywotność szczepu probiotycznego w porównaniu z zastosowaniem tych samych warunków wobec wolnego szczepu.

- Kolejnym etapem był dobór układu konserwującego oraz opracowanie formuacji bazowej (w postaci emulsyjnej) dla mikrosfer probiotycznych (MP). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie mikrosfer alginianowych jako nośnika pozwala na przeżycie bakterii probiotycznych w formuacji, pomimo obecności układu konserwującego (przeżywalność komórek bakteryjnych na poziomie 6,13 log CFU/g po 120 dniach przechowywania). Natomiast, wprowadzenie do preparatu wolnego szczepu bakteryjnego (braku ochrony szczepu w postaci mikrosfer) skutkowało całkowitą eliminacją żywych komórek probiotycznych.

- Równolegle, opracowano stabilne formuacje oleożelowe, do których również włączono nośniki alginianowe zawierające bakterie probiotyczne. Ze względu na brak zawartości wody w takich preparatach, układy te nie muszą zawierać konserwantów, a więc stanowią alternatywę dla preparatu w formie emulsji.

- W wyniku dalszych prac dokonano modyfikacji nośnika, w celu zwiększenia stopnia przeżywalności bakterii podczas przechowywania oraz maksymalnego uszczelnienia struktury mikrosfer alginianowych. Jako źródło prebiotyczne wybrano mąkę z tapioki ze względu na jej korzystny wpływ na wzrost szczepu *Lactobacillus casei* podczas fermentacji w bulionie MRS. Optymalne mikrosfery alginianowo – tapiokowe zostały dodatkowo poddane procesowi powlekania, aby uszczelnić ich strukturę i uzyskać maksymalny poziom hermetyczności nośnika. W tym celu, jako środki powlekające zastosowano roztwory biopolimerów, takich jak żelatyna, chitozan i kwas hialuronowy. Uzyskane z badań wyniki wykazały, że już sam dodatek mąki z tapioki (powłoki prebiotycznej) miał pozytywny wpływ na modyfikację powierzchni mikrosfer (wygładzenie porowatej struktury mikrosfer). Dodatkowe powlekanie biopolimerami pozwoliło uzyskać maksymalny stopień hermetyczności. Ponadto połączenie powłok: prebiotycznej i biopolimerowej mikrosfer, w szczególności przy użyciu kwasu hialuronowego i chitozanu, znacząco poprawiło przeżywalność i żywotność szczepu probiotycznego podczas długoterminowego przechowywania. Najwyższy wskaźnik przeżywalności szczepu probiotycznego odnotowano w przypadku mikrosfer alginianowo – tapiokowych pokrytych kwasem hialuronowym i wyniósł on 5,48 log/CFU g. Po 30 dniach przechowywania, przeżywalność szczepu w tym układzie nośnikowym utrzymywała się na poziomie 89%.

- W kolejnym etapie badań zmodyfikowane MP wprowadzono do uprzednio opracowanej formuacji kosmetycznej. Następnie przeprowadzono badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzające efektywność działania na mikrobiom skóry. Badania *in vitro* obejmowały:

ocenę cytotoksyczności i wpływu na proliferację komórek, analizę poziomu interleukin IL-6 i IL-8 metodą ELISA, test gojenia się ran “scratch assay” oraz ocenę wpływu formułacji kosmetycznej zawierającej MP na mikroorganizmy tworzące mikrobiom skóry. W celu określenia potencjalnej toksyczności próbek przeprowadzono badania na modelu komórkowym imitującym skórę, wykorzystując linie komórkowe keratynocytów (HaCaT) oraz fibroblastów (HSF). Test MTT wykazał brak cytotoksycznego działania formułacji wobec keratynocytów do stężenia 2,5%, natomiast w przypadku fibroblastów – do 5%. Dane uzyskane w teście gojenia ran wykazały potencjał formułacji zawierającej MP jako preparatu o właściwościach proregeneracyjnych. Dodatkowo, badania mikrobiologiczne wykazały, że formułacja zawierająca MP ograniczała przeżywalność patogennych szczepów (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. neoformans*) w porównaniu do formułacji bazowej, pozbawionej bakterii mlekowych. Natomiast, badania *in vivo* potwierdziły skuteczną kolonizację skóry probantów przez bakterie probiotyczne po zastosowaniu preparatu zawierającego MP.

- Podsumowując, badania przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają, że opracowana technologia mikroenkapsulacji, umożliwia kapsułkowanie bakterii probiotycznych z wysoką wydajnością enkapsulacji, a opracowane formułacje kosmetyczne i dobór układu konserwującego zapewniają ochronę probiotyków zarówno przed degradacją, jak i nadmiernym (niekontrolowanym) rozmnażaniem. Ponadto, uzyskane wyniki badań *in vitro* i *in vivo* potwierdzają bezpieczeństwo formułacji, a także wykazują jej antybakteryjne i normalizujące mikroflorę działanie.

13. ABSTRACT

- Due to the numerous health benefits of probiotic bacteria, there is a huge demand for products containing them, which are used in the food and pharmaceutical industries to regulate the gut microbiome and fight antibiotic resistance. In the case of the cosmetics industry, the challenge remains to meet the compositional requirements of cosmetics while maintaining viable bacterial cells in potential probiotic formulations. One promising solution to increase the survivability of probiotics is their microencapsulation.

- The aim of the work was to develop a cosmetic formulation that would allow for the effective introduction of live probiotic bacteria while meeting the requirements for cosmetic products. Therefore, it was necessary to develop a microencapsulation technology that would enable the encapsulation of probiotic microorganisms with high encapsulation efficiency and survival over time.

- The first stage of the research was to search for an effective form, a carrier for live probiotic strains and to optimize the carrier composition. As a result of the analysis, approximation profiles were obtained, which allowed to determine the optimal process parameters. Based on the conducted research, stable alginate microspheres with sizes from 10 to 30 micrometers were obtained. The shape and size of the microspheres were observed using an optical microscope. The morphology of the obtained carriers was observed using SEM and TEM. Based on the obtained optimization, samples of stable microdispersion and microspheres were prepared for further research and for the microbiological part: calcium chloride concentration (cross-linking agent) equal to 0.3 mol/dm³, CaCl₂ instillation rate at the level of 10 drops per minute and ultrasonication process amplitude of 69%. EE was checked using different centrifugation speeds (no centrifugation, 500 rpm and 30,000 rpm).

- Next, the suspension of the probiotic strain and the microspheres obtained from it were subjected to the action of various physicochemical factors such as: temperature, UV radiation, pH and the action of a preservative. The assessment of the viability of free and encapsulated probiotic cells was made by counting bacterial colonies grown on plates with MRS agar medium after using the pour plate inoculation technique. The obtained results showed that the alginate microsphere carrier had a positive effect on the viability of the probiotic strain compared to the application of the same conditions to the free strain.

- The next stage was the selection of a preservative system and the development of a base formulation (in emulsion form) for probiotic microspheres (MP). Based on the conducted studies, it was found that the use of alginate microspheres as a carrier allows the

survival of probiotic bacteria in the formulation, despite the presence of the preservative system (bacterial cell survival at the level of 6.13 log CFU/g after 120 days of storage). On the other hand, the introduction of a free bacterial strain to the preparation (no strain protection in the form of microspheres) resulted in the complete elimination of live probiotic cells.

- Simultaneously, stable oleogel formulations were developed, which also included alginate carriers containing probiotic bacteria. Due to the absence of water in these preparations, these systems do not require preservatives, making them an alternative to emulsified formulations.

- As a result of further work, the carrier was modified in order to increase the survival rate of bacteria during storage and to maximally seal the structure of alginate microspheres. Tapioca flour was selected as the prebiotic source due to its beneficial effect on the growth of *Lactobacillus casei* during fermentation in MRS broth. The optimal alginate-tapioca microspheres were additionally subjected to a coating process to seal their structure and obtain the maximum level of carrier hermeticity. For this purpose, biopolymer solutions such as gelatin, chitosan and hyaluronic acid were used as coating agents. The results obtained from the studies showed that the addition of tapioca flour (prebiotic coating) alone had a positive effect on the modification of the microsphere surface (smoothing the porous structure of the microspheres). Additional coating with biopolymers allowed for obtaining the maximum degree of hermeticity. Moreover, the combination of prebiotic and biopolymer coatings of microspheres, in particular using hyaluronic acid and chitosan, significantly improved the survival and viability of the probiotic strain during long-term storage. The highest probiotic strain survival rate was recorded for alginate – tapioca flour microspheres coated with hyaluronic acid and was 5.48 log/CFU g. After 30 days of storage, the viability of the strain in this carrier system remained at 89%.

- In the next stage of the study, modified MP were introduced into the previously developed cosmetic formulation. Then, in vitro and in vivo studies were conducted to confirm the effectiveness of the action on the skin microbiome. In vitro studies included: assessment of cytotoxicity and the effect on cell proliferation, analysis of the level of interleukins IL-6 and IL-8 using the ELISA method, a wound healing test "scratch assay" and an assessment of the effect of the cosmetic formulation containing MP on microorganisms that make up the skin microbiome. In order to determine the potential toxicity of the samples, tests were carried out on a cell model imitating the skin, using cell lines of keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (HSF). The MTT test showed no cytotoxic effect of the formulation on keratinocytes up to a concentration of 2.5%, while in the case of fibroblasts - up to 5%. The data obtained in the

wound healing test showed the potential of the formulation containing MP as a preparation with pro-regenerative properties. In addition, microbiological studies have shown that the formulation containing MP limited the survival of pathogenic strains (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. neoformans*) compared to the base formulation, devoid of lactic acid bacteria. In vivo studies, on the other hand, confirmed the effective colonization of the skin of probiotic bacteria after the use of the formulation containing MP.

- To summarize, the research presented in this paper confirms that the developed microencapsulation technology allows for the encapsulation of probiotic bacteria with high encapsulation efficiency, and the developed cosmetic formulations, along with the selection of a preservative system, ensure the protection of probiotics both from degradation and excessive (uncontrolled) reproduction. Furthermore, the obtained *in vitro* and *in vivo* study results confirm the safety of the formulations, as well as demonstrate their antibacterial and microbiome-normalizing effects.

14. Kopie publikacji

[1C]



Review

Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications

Anna Łętocha ^{*}, Małgorzata Miastkowska and Elżbieta Sikora

Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Krakow, Poland

^{*} Correspondence: anna.letocha@doktorant.pk.edu.pl

Abstract: Alginates are the most widely used natural polymers in the pharmaceutical, food and cosmetic industries. Usually, they are applied as a thickening, gel-forming and stabilizing agent. Moreover, the alginate-based formulations such as matrices, membranes, nanospheres or microcapsules are often used as delivery systems. Alginate microparticles (AMP) are biocompatible, biodegradable and nontoxic carriers, applied to encapsulate hydrophilic active substances, including probiotics. Here, we report the methods most frequently used for AMP production and encapsulation of different actives. The technological parameters important in the process of AMP preparation, such as alginate concentration, the type and concentration of other reagents (cross-linking agents, oils, emulsifiers and pH regulators), agitation speed or cross-linking time, are reviewed. Furthermore, the advantages and disadvantages of alginate microparticles as delivery systems are discussed, and an overview of the active ingredients enclosed in the alginate carriers are presented.

Keywords: alginate; microparticles; active substances; probiotics; encapsulation techniques



Citation: Łętocha, A.;

Miastkowska, M.; Sikora, E.

Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 3834. <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

Academic Editor: Dan Cristian Vodnar

Received: 23 August 2022

Accepted: 11 September 2022

Published: 14 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

“Microparticle” is the term used for spherical particles with diameters in the micrometer range, typically from 1 to 1000 µm. Polymeric microparticles are usually formed by a polymer matrix in which a smaller amount of an active compound could be immobilized [1]. Generally, taking into account the method of microparticle preparation, their morphology, and the distribution of the encapsulated actives, microparticles can be divided into two categories: “microspheres” and “microcapsules” [1–4].

Microspheres usually are characterized as matrix systems in which the active substance is homogeneously dispersed. In contrast, microcapsules are heterogenous particles where a membrane shell surrounds the core (solid or liquid) and forms a reservoir with an encapsulated active compound [1,5,6]. In some cases, to overcome problems with the mechanical stability of such, the carriers and low-actives-loading, polymer-coated microspheres are obtained [7,8].

Compared with other effective carriers of the active compounds, such as nanoparticles, the advantage of the microcarriers is that they do not penetrate into the *interstitium*, and thus act locally [5,9]. The choice of microcapsules over nanocapsules in the case of cosmetic products can be an ideal solution for epidermal action, where the encapsulated ingredient is designed to act on the top of the *epidermis*. Moreover, nanocapsules are not suitable, due to their small size, to encapsulate active ingredients with larger than nano sizes, including bacteria.

The microparticles can be prepared from a large variety of starting materials, both natural and synthetic origin, and with different preparation techniques. Most drug delivery systems are prepared using natural polymers, such as polysaccharides (e.g., starch, dextran, alginate, hyaluronic acid and chitosan) or proteins (e.g., collagen, gelatin and albumin) [10,11]. Among synthetic polymers applied to obtain the carriers, there are

poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), poly(sebacic anhydride) and poly(ϵ -caprolactone) [2]. Moreover, thermosensitive polymers, e.g., poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) [12], and pH-sensitive polymers (Eudragit L100 and Eudragit S100) are used [13,14].

Among the natural raw materials used to obtain microparticles, alginates are the most popular and deserve special attention. In the food industry, alginate-based formulations are used as texture modifiers [15–17] or to improve the stability and long-term efficacy of active compounds [18–20]. In the case of the cosmetic and pharmaceutical industries, alginate systems are used to improve stability and to protect the encapsulated compounds against external conditions, e.g., UV light, temperature [21–23], or gastric environments in the case of oral application [24–27]. The alginate microparticles (AMP) are biocompatible, biodegradable and nontoxic delivery systems allowed to encapsulate different active substances, including probiotics [28–30].

The objective of this article was to provide a review of the techniques used for AMP production. The most popular alginate encapsulation methods, such as the spray-drying technique, extrusion and emulsification are described. The technological parameters important in the microencapsulation process and their impact on the quality of the alginate carriers are discussed. Particular attention was paid to the microencapsulation of alginates based on the emulsification technique, as the process allows to obtain small microparticles, containing both hydrophilic and hydrophobic ingredients with high efficiency. Moreover, the examples of the actives enclosed in the AMP, and their application in the food, pharmaceutical and cosmetic industries, are presented. Most scientific articles focus on applications of AMP in the food and pharmaceutical industries [28,31–33]. Recently, the environmental application of alginate carriers has also appeared more often [34]. However, the cosmetics industry has not been the subject of wide scientific interest so far.

2. Alginate Characteristics

Alginates are natural polysaccharides, polyanionic polymers, obtained from marine algae [35,36], usually from three species of marine brown algae, Phaeophyceae: *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina*. The structure of alginates depends on the source of the sea algae, i.e., its species, geographic origin, or seasonal varieties [37]. Alginates are unbranched copolymers of D-Mannuronic acid (M block) and L-Guluronic acid (G block) linked by β (1–4) glycosidic bonds [37–43]. These blocks are arranged in an irregular block pattern with different GG, MM and MG block proportions (Figure 1) [30,35,37,38,42]. Blocks M and G are placed in the different locations along the chain (e.g., MMMM, GGGG, MMGG, GMGM) and in various amounts [38].

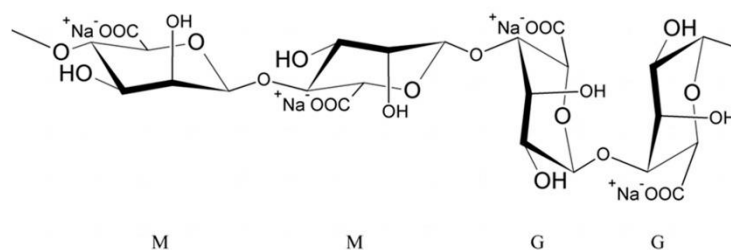


Figure 1. Structure of sodium alginate.

Cross-Linking of Alginates

Monovalent metal ions with alginates form soluble salts, while divalent and multivalent cations (except Mg^{2+}) form gels or precipitate. The affinity of alginates to various cations and selective ion binding are the basis of the alginates' ability to form hydrogels. Alginates containing a large number of guluronic acid blocks form gels with much greater strength compared with mannuronate-rich alginates because G blocks have a stronger

affinity with divalent ions than M blocks [35]. The interaction of alginates with divalent cations, which are in particular calcium cations, leads to the formation of biodegradable gels [38]. Polymerization is based on the cross-linking of copolymers through ionic bonds between Ca^{2+} cations and alginate anions [38,44]. Each Na^+ cation ionically binds to only one carboxyl group of the alginate chain, while the Ca^{2+} cation interacts with two carboxyl groups that come from different polymer chains. The exchange of Na^+ ions into Ca^{2+} ions is relatively easy and takes place when an aqueous solution of sodium alginate is mixed with a solution containing calcium ions [41]. The mechanical properties of the formed gels are determined by both the concentration of divalent ions and the alginic acid salts in the reaction mixture [38,44]. The distinctive molecular structure resulting from these interactions is referred to as the “egg-box” model (Figure 2) [38,44–46]. It should be underlined that only the G blocks take part in the cross-linking process. The homopolymers of G blocks form ordered, three-dimensional regions wherein Ca^{2+} ions are embedded like eggs in a cardboard box [47].

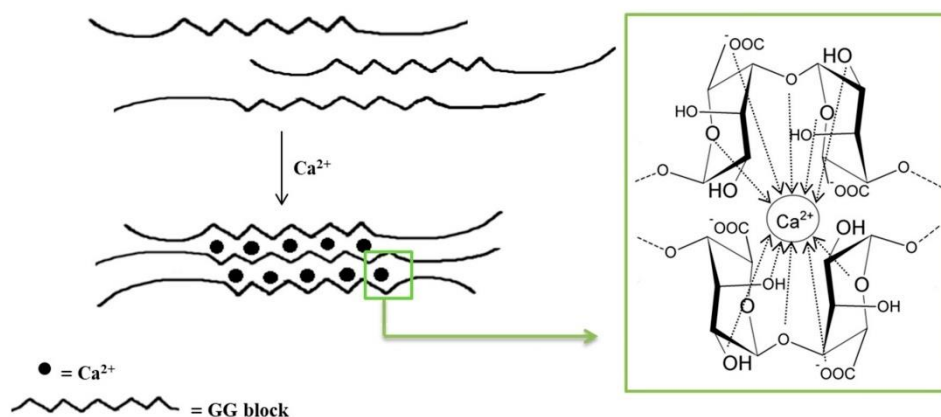


Figure 2. Scheme of an alginate gel formation by calcium cations (“egg-box” model).

The immediate cross-linking of alginates, due to the action of calcium ions, causes the formation of particles of different diameters and different porosity [48]. The gel strength increases with the increase in G blocks content. Moreover, the parameters of the cross-linking process are important. Temperatures ranging from 60 to 80 °C are needed to dissolve alginates in the water. Moreover, it is known that alginate gels are insoluble in acidic environments [49]. Additionally, the technique used to obtain alginate particles influences the capsule size, which can range in size from nanoparticles to macroparticles. Macroparticles are particles larger than 1000 microns in size and are easily visible [50,51]. They are applied especially in the field of dietary supplements [52] or drugs [53–56]. The size of microparticles ranges from 100 nanometres to 1000 μm [57–59], and particles with a diameter below 100 nanometres are classified as nanoparticles [60].

3. Alginate Encapsulation Techniques

Generally, microencapsulation techniques are classified into three groups [61–63]:

- Physical methods such as spray drying, extrusion, lyophilization, supercritical fluid precipitation and solvent evaporation;
- Physico-chemical methods including coacervation, liposomes and ionic gelation;
- Chemical methods such as interfacial polymerization and molecular inclusion complexation.

In the case of alginate capsules preparation, the most frequently used methods are the spray-drying technique and either extrusion or emulsification/gelation [61].

3.1. Spray-Drying Technique

The spray-drying technique is the oldest technique used in alginate capsules. The concept of this method was first described in Samuel Percy's patent in 1872 [64]. The process was introduced commercially in the 1920s, but spray drying was fully applied on a large scale in the early 1980s [65,66]. In this method, initially, a solution containing the active ingredient should be prepared with the dissolved polymer matrix. The solution is then pressurized and sprayed to form a "mist" in the drying chamber. Hot gas (air or nitrogen) is also blown into the drying chamber. The hot gas makes it possible to evaporate the solvent. The capsules are then transported to a cyclone separator for recovery [3]. In this technique, the control of the product's feed, gas flow and temperature is important [67,68]. Figure 3 shows a schematic representation of the spray-drying procedure [3,63].

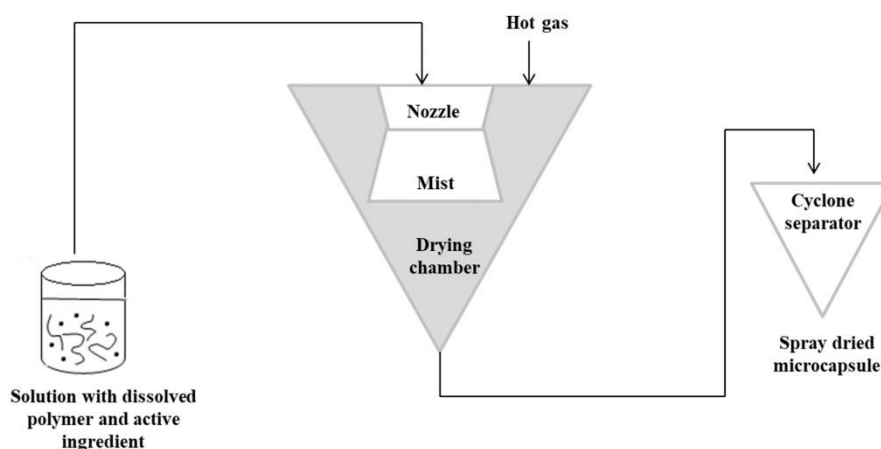


Figure 3. Scheme of the spray-drying encapsulation technique.

The spray-drying technique is applicable to encapsulate different kind of actives. Among substances encapsulated in alginate capsules, there were lipids [69] and hydrocarbons such as cellulase [70], carvacrol [71], or insulin [72]. Unfortunately, the main disadvantage of this method is the impossibility to encapsulate substances sensitive to elevated temperature and pressure.

3.2. Extrusion Technique

Another technique that has been used for a long time for producing microparticles is the extrusion technique [73]. It consists of the preparation of a hydrocolloid solution (an aqueous dispersion of a natural or synthetic polymer), e.g., sodium alginate. Then, the material for encapsulation is added to the solution, and the suspension is pressed into droplets into the gelling or hardener solution, e.g., calcium chloride [3,30,39,49,67,74–77]. Depending on the scale (laboratory or pilot scale), a syringe needle or an extruder is used for the process, respectively [39]. The size and shape of the obtained beads depend on factors such as the diameter of the needle and the distance of the needle from the hardener solution. This technique is the most popular in laboratory scale because of simplicity and low cost of production [78]. However, the main limitation in the case of its application in the large scale is the fact that microparticles are formed slowly [30].

3.3. Emulsification Technique

An alternative method commonly used to obtain alginate capsules is emulsification. The emulsification technique is more expensive than the extrusion method because a large amount of oil is needed to prepare the emulsion [79]. In this technique, the discontinuous

phase (mixture of hydrocolloid and encapsulated material) is added to a large volume of continuous oil phase oil [3,30,39,46,49,67]. In the case of food applications, vegetable oils are used as a continuous phase, most often canola, sunflower or corn oils [78,80]. Additionally, to stabilize the droplets of the internal phase, an emulsifier should be added to the mixture formed. The obtained water-in-oil emulsion is continuously homogenized by stirring [3,30,39,49,67]. The speed of the emulsion mixing is a critical step because it affects both the shape and size of the capsules formed [81]. Very large capsules (around 1000 μm in diameter or larger) can result in poorly coated structures and a coarse texture [82], which in turn affects the dispersion quality of the capsules in the final product [79]. The final emulsion containing alginate droplets is broken by adding calcium chloride solution and centrifuged, thereby separating the oil and water phases to obtain microspheres [83,84]. Figure 4 shows a diagram of the encapsulation process using extrusion and emulsification techniques [46,67].

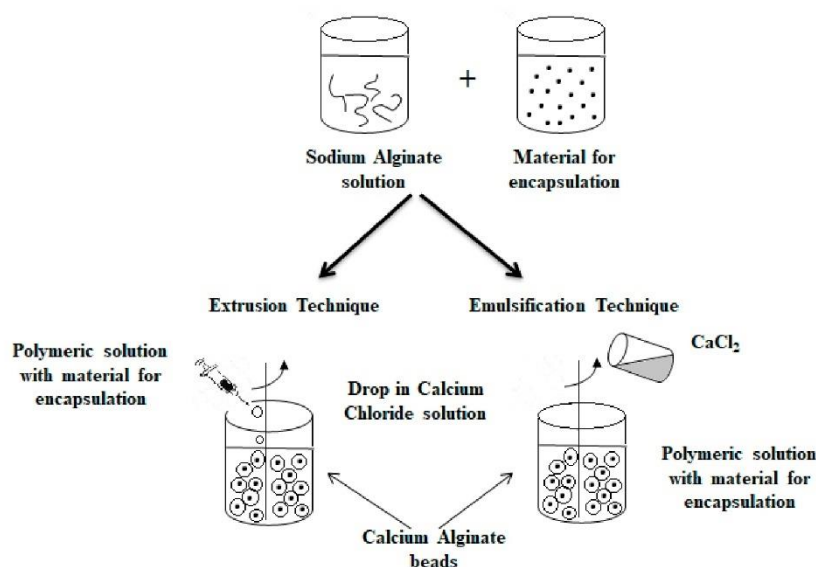


Figure 4. Scheme of the encapsulation process by extrusion (on the (left)) and by emulsification technique (on the (right)).

The main difference between the two techniques is the sequence of combining the alginate and calcium chloride solutions. The polymer solution containing the active ingredient is introduced into the calcium chloride solution in the case of the extrusion technique as opposed to the emulsification technique, where the CaCl_2 solution is dripped into the polymer solution. Depending on the method used to obtain them, the calcium alginate beads are called balls (gelled droplets obtained by extrusion technique) or capsules, in the case of the products of the emulsification technique [85]. The main differences between these alginate beads are listed below [49,78,85,86]:

- The balls have a porous network, while the capsules have a liquid core (water or oil);
- The dimensions of the balls are much larger than in the case of the capsules;
- The balls are uniform in size and shape in contrast to differing in size in capsules.

The differences in the morphology (structure) of both the microparticle types are perfectly illustrated in images obtained by electron microscopy TEM and SEM [87].

To sum up, some advantages and disadvantages of the above-presented methods of AMP preparation are summarized in Table 1.

Table 1. Advantages and disadvantages of alginate microencapsulation methods [3,79,84,88–90].

Method	Advantages	Disadvantages
Extrusion	- simple and cheap method - no use of harmful solvents - no use of large amounts of oil and emulsifier - in the case of probiotics, no damage to the probiotic cell and high viability	- slow formation of microparticles → a problem in a large-scale application - limited choice of encapsulated actives
Emulsification	- the possibility of encapsulating both hydrophilic and hydrophobic ingredients - high process efficiency - the possibility of obtaining smaller microparticles than in extrusion and spray drying methods - easy to scale up and fewer restrictions on preparation devices - high survival rate of probiotics	- higher costs than in the case of extrusion due to the use of a large amount of oil and emulsifier - toxicity of organic solvents and droplet agglomeration due to solvent removal in the case of microcapsules formed from a complex at the interface of emulsion droplets
Spray-drying	- low cost - high efficiency and quality of the obtained microparticles - adaptable to most typical industrial devices	- nonuniform capsules - material losses due to the adherence of substance particles to the drying chamber - limitations in the choice of coating material - in the case of probiotics, the loss of viability due to the high-temperature drying requirement

The data presented in Table 1 indicate that the currently used alginate encapsulation techniques are not universal. All methods have some pros and cons, but among the others, the emulsification is more universal. The method allows to obtain small microparticles, containing both hydrophilic and hydrophobic ingredients with high process efficiency. Moreover, the microencapsulation of alginates based on the emulsification technique could be modified by differing the polymer gelling process.

4. Microencapsulation of Alginates Based on Emulsification Technique

The emulsification process is based on the mechanism of external or internal gelling. Both water-in-oil (W/O) and oil-in-water (O/W) emulsions could be used to prepare microparticles. Depending on the gelling system used, the obtained microparticles can have different properties and thus different applications. The properties differentiating the external and internal gelling are: pore size, stiffness, permeability and strength of the matrix. Alginate microspheres prepared with external gelling have smaller pores and a denser surface structure than inside the capsule. In turn, microspheres obtained by internal gelling have a more homogeneous structure, which is associated with a more uniform distribution of cations in the particle [91–94].

4.1. Alginate Microspheres Formed in a W/O Emulsion—External Gelation

In the external gelation emulsification method, an alginate solution containing the encapsulated active substance is emulsified in the oil phase to form a W/O emulsion. Next, a cross-linking compound, e.g., calcium chloride solution, is gradually added to the emulsion [42,95–97]. The addition of CaCl_2 solution causes the droplets of the alginate emulsion to gel and form microspheres [4,98]. The calcium chloride particles in the solution migrate according to the principle of diffusion to the phase interface of the droplets of the alginate emulsion (the dispersed phase), where they dissolve in the aqueous phase and cause gelation to form the microspheres [98]. This step is followed with filtration and rinsing to remove residual oil. In this method, the obtained microspheres consist of a soft core and a rigid outer matrix [29,99].

4.2. Alginate Microspheres Formed in a W/O Emulsion—Internal Gelation

In an internal gelation process, insoluble calcium crystals (e.g., calcium carbonate) are dispersed in an aqueous polysaccharide solution and serve as an internal calcium source. This mixture is emulsified in an oil phase containing a surfactant. Upon pH reduction, from 7.5 to 6.5, calcium (Ca^{2+}) is released from the calcium complex causing gelation to form calcium alginate. To lower the pH, usually an oil-soluble organic acid such as acetic acid is gently added to the oil, causing immediate diffusion into the water phase. In this way, the immediate lowering of the pH of the dispersed droplet, solubilizing the crystalline calcium, causes rapid gelling [4,29,98,100].

Considering the gelation process, two successive reactions follow after diffusion of the oil-soluble acid through the oil–water interface. Protons that diffuse into the aqueous gel phase encounter evenly spaced calcium microcrystals, usually CaCO_3 , which causes the immediate release of calcium ions (1) and in situ gelling of the alginate, creating a homogenous gel network (2). Below is the course of the reactions taking place [29,100]:



Internal gelation produces symmetrical microspheres with large pores and a low matrix density compared with external gelation [29,101].

A schematic representation of microsphere formation with internal and external gelation is shown in Figure 5 [4,29,98].

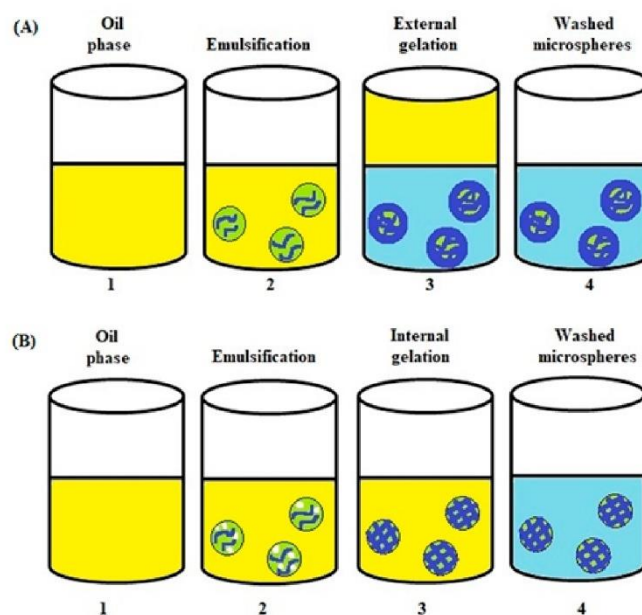


Figure 5. Schematic representation of microsphere formation with emulsification coupled with external (A) and internal gelation (B). (A) 1. Continuous oil phase. 2. Emulsifying an alginate solution in the oil phase (creating a W/O emulsion). 3. Addition of CaCl_2 solution to the oil phase (external gelation of the alginate microspheres). 4. Washed alginate microspheres. (B) 1. Continuous oil phase. 2. Emulsifying an alginate solution (containing an insoluble calcium source) in the oil phase (creating a W/O emulsion). 3. Solubilization of the calcium source by adding acid and lowering the pH inside the beads (internal gelation of the alginate microspheres). 4. Washed alginate microspheres.

4.3. Gelation at the Interfacial Area of Emulsion (Complexation)

One method of forming an emulsion is to deposit the polymer at the interface of the emulsion droplets and then remove the solvent used [102]. The polymer coating that deposits the polymer at the interface is stabilized with covalent or physical intermolecular forces due to the addition of a cross-linking agent. The scheme of creating microcapsules in this way is shown in Figure 6 [4,29].

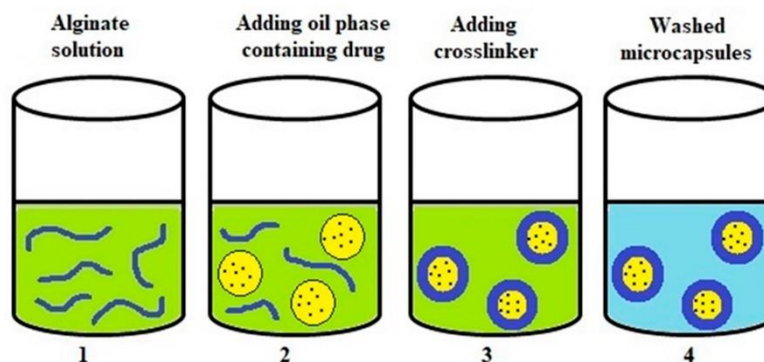


Figure 6. Schematic representation of microcapsule formation. 1. Alginate solution. 2. The oil phase, containing the encapsulating ingredients, is emulsified in the alginate solution. 3. The addition of CaCl_2 solution and formation of alginate microcapsules at the interface of the oil droplets. 4. The solvent is removed, and the microcapsules are isolated and washed.

In this method, microcapsules are synthesized in an aqueous solution and at the interface of oil drops. The preparation of alginate microcapsules is accomplished by mixing the encapsulated component (usually hydrophobic drugs) with an organic solvent such as ethanol or acetone to form the inner phase (oil phase) of the microcapsules [103]. The previously prepared mixture is added to the alginate solution containing, among others, Tween 80 as a surfactant. It is then subjected to homogenization or sonication to produce an O/W emulsion. The calcium chloride solution is slowly added to the formed emulsion, which causes the alginate to cross-link and form microcapsules. The core of the so-prepared microcapsules consists of an oily liquid surrounded by a single polymer layer. The microcapsule suspension is equilibrated for several hours. Finally, the solvent is removed under reduced pressure and the microcapsules formed are washed and isolated [42,104,105]. Capsules of different row sizes can be obtained with this method. It has been used for encapsulating, among others, testosterone [106] or essential oils [107].

In the case of the emulsification technique, core/shell microparticles with a liquid core are formed. However, the latest few reports also characterized the AMP with a solid core. For example, in a recent paper by Dubashynskaya et al., microparticles consisting of a core made of partially deacetylated chitin nanowhiskers and an alginate shell were used for the topical drug delivery of metronidazole [108].

5. Factors Influencing the Alginate Microparticle Formation Process

During the manufacture of AMP, regardless of the technique used, various factors are key parameters. The alginate concentration, type and concentration of cross-linking vector, type of oil, emulsifiers, pH regulator, agitation speed and cross-linking time influence the quality of alginate microparticles (size, shape, stability and encapsulation efficiency).

5.1. Concentration of Sodium Alginate

Chan et al. [109] highlighted the effect of alginate concentration on the size of beads prepared by use of the extrusion method. They observed that the concentration of alginate

below 1% resulted in the formation of nonspherical capsules, probably due to the lack of a sufficient number of carboxyl groups for the gelling process. On the other hand, when the concentration of sodium alginate was higher (>5%), the increase in the viscosity of the aqueous phase resulted in larger droplets with broad distribution. This is consistent with the studies by Liu et al. [110], who investigated the effect of alginate concentration on the size of capsules produced with the emulsification technique/internal gelation.

In the case of the microencapsulation of bacteria, Mandal et al. [111], investigated the effect of alginate concentration on the survival of microencapsulated bacteria in the emulsification technique/external gelation. They used alginate concentration in the range of 2–4%. The obtained results show that an increase in alginate concentration results in better resistance to unfavorable conditions in the gastrointestinal tract, which may be due to the more rigid structure of the microspheres with the use of a higher concentration of alginate. Similar results were obtained by Lotfipour et al. [112], who conducted research on the microencapsulation of bacteria with the extrusion technique. They additionally found that the mean bead diameters increased significantly with increasing alginate concentration, which can be attributed to the greater viscosity of the resulting gel. According to research in this area, an increase in the viscosity of the starter gel leads to the production of larger beads with extrusion. Therefore, for a given application, the alginate concentration must be controlled in terms of particle size, shape and particle distribution.

5.2. Type and Concentration of Cross-Linking Agent

Alginate gels cross-link in the presence of divalent cations. Chan et al. [109] investigated the effect of various cations on the properties of alginate gels. In the study, they used cations of calcium, barium, strontium, potassium, aluminum, lithium, ammonium and copper. It was found that only a few cations (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} and Cu^{2+}) can form spherical alginate shells. Aluminum ions did not form spherical capsules, while potassium, lithium and ammonium ions did not form gels with alginate under experimental conditions. Earlier studies have shown that several divalent cations can bind to alginates of different affinity in the following order: $\text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$, Ni^{2+} , $\text{Co}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Pb}^{2+}$ [113,114]. In addition, Chan et al. [109] investigated the influence of cation type on the strength of formed alginate gel. The gel strength was expressed in Young's modulus. Cations of copper (802 kPa), in comparison with barium (592 kPa), strontium (464 kPa) and calcium (339 kPa), formed the strongest gels. This is in accordance with results obtained by Harper et al. [113,115]. They concluded that the size of used cation affects the strength of the alginate gel. The larger cations (such as Ba^{2+} and Sr^{2+}) provide stronger binding forces in the junction zones, thus forming stronger gels. Although cations of barium and copper formed stronger alginate gels, calcium is the most popular cation used to cross-link alginates. Ca^{2+} is considered clinically safe, readily available and economical [100]. Additionally, the alginate microspheres and microcapsules could be chemically cross-linked by covalent bonds (using, for example, epichlorohydrin) [116,117], offering the potential for microgel preparation with highly controllable porosities and cell interactions [118], or by ionic bonds with cationic polymers such as N,N'-methylene bisacrylamide [119].

Walczak et al. [41] conducted research on the effect of CaCl_2 concentration on calcium alginate cross-linking using the extrusion method. It has been observed that with an increase in calcium chloride concentration (0.075–0.5 M), the number of microparticles obtained decreased, while their hardness increased. The gel's hardness increase is a consequence of alginate cross-linking increasing along CaCl_2 concentration. On the other hand, calcium chloride concentration (1–4%) had no significant effect on the size and an encapsulation efficiency of the alginate beads. Won et al. [120] studied the effect of CaCl_2 concentration on the efficiency of lipase encapsulation with the extrusion method. They did not observe a significant effect of CaCl_2 concentration on the immobilization efficiency. These results are similar to those obtained by Lotfipour et al. [112], who studied the influence of calcium chloride concentration on the encapsulation of bacteria in alginate beads with the extrusion technique. It seems that the excess of Ca^{2+} ion concentration above

a certain level (3 M) does not affect the formation of gel networks, and as a consequence, the efficiency of encapsulation [120].

5.3. Type and Concentration of the Emulsifier

Surfactants pose two functions in emulsification processes. The first one is to lower the interfacial tension between the water and oil phases and to facilitate the dispersion of a viscous solution of alginate in the oil. The second one is to stabilize the emulsion droplets against coalescence [100,110]. Various emulsifiers have been found useful in the emulsifying/gelling processes of alginate emulsions. Table 2 shows examples of emulsifiers used in the production of AMP.

Table 2. Surfactants used in the production of alginate microparticles.

Trade Name	Concentration of Emulsifier [%]	Encapsulation Techniques	References
Lecithin	0.1; 0.5; 1.0; 2.0	Emulsification/internal gelation	[121]
Span 80	0.5–2.0	Emulsification/internal gelation	[110]
Span 80	0–3.0	Emulsification/internal gelation	[122]
Span 80	2.0	Emulsification/external gelation	[123]
Span 80	2.0	Emulsification/external gelation	[124]
Span 85	2.0	Emulsification/external gelation	[125]
Span 85	-	Emulsification/internal gelation	[126]
Tween 20	0.5; 2.0	Extrusion	[127]
Tween 20	0.1	Extrusion	[128]
Tween 80	0.02	Emulsification/external gelation	[83]
Tween 80	-	Spray-drying	[69]
Tween 80	-	Spray-drying	[71]
Tween 80	-	Emulsification/complexation	[106]
Tween 80	0.2	Emulsification/external gelation	[129]
Mixture: Span 80 and Tween 80	1.0 Span 80 and 1.0 Tween 80	Emulsification/external gelation	[19]
Mixture: Span 80 and Tween 80	1.0 (mixture 60/40)	Emulsification/internal gelation	[130]
polyglycerol polyricinoleate (PGPR)	4.0–15.0	Emulsification/internal gelation	[131]

The data in the table show that the most commonly used surfactants in the microemulsion method are nonionic sorbitan esters. This is most likely due to the fact that they are the most popular surfactants used to stabilize microemulsions. Another important parameter in the case of the microparticles obtaining process is the concentration of these emulsifiers.

Liu et al. [110] conducted a study in which they found that the size of calcium alginate capsules in the emulsification technique/internal gelation significantly decreased from 218 μm to 76.7 μm with an increase in the surfactant concentration (Span 80) from 0.5–2.0%. Since the surfactant is adsorbed on the surface of the droplets of the dispersed phase and forms a film to prevent their coalescence, lower surfactant concentration results in not completely covering the surface of the droplets, which declines droplets stability. Coalescence causes larger droplets. On the other hand, emulsifier concentration above 2.0% is of little benefit to the formulation as the oil-soluble acid (glacial acetic acid) should diffuse across the interface of water and oil to initiate the gelling reaction. Therefore, a high concentration of the surfactant may result in resistance to mass transfer to protons, prolonging gelation and resulting in low particle production [110]. A similar finding was presented by Alnaief et al. [122]. An increase in the emulsifier concentration leads to a reduction in the interfacial tensions between the alginate and the oil phase of the emulsion, and thus to the reduction in the average size of the microspheres.

5.4. Effect of an Oil Type on Alginate Capsule Properties

Food-grade and mineral oils are commonly applied in the process of alginate microspheres preparation. However, mineral oils have a potentially greater risk to the environment [132], and therefore food-grade oils are used more frequently. Among food-grade oils, the following are used: corn oil [129], canola oil [133], sunflower oil [20], soy bean oil [84] and olive oil [134]. The effect of the oil phase on the properties of microparticles has not been extensively studied. It is reported that the mean particle diameter obtained depends on the viscosity of the oil used; therefore, the choice of oil depends on the required particle size. For example, Wang et al. found that the particles were larger and additionally had a wider particle size distribution when olive oil was used compared with liquid paraffin oil, because the viscosity of olive oil compared with liquid paraffin oil was higher [134].

5.5. pH Values

The pH range for encapsulation depends on several parameters such as the type of polysaccharide, the ion vector and the kind of encapsulating agent [100]. In general, the complex of cationic and anionic ions is formed as a result of electrostatic interactions between charged particles [29,135]. The strength of the polyelectrolyte complex is significantly influenced by the pH value of the solution [29,136]. For a given hydrocolloid, the pH range that will be optimal and will provide the greatest number of ionized or protonated groups required for interaction should be checked. In the case of alginate, the pKa ranges from 3.4 to 4.4. When emulsion pH is higher than pKa, alginate carboxylate groups are ionized and electrostatically linked to cationic polymers and calcium ions [29,137]. Additionally, negatively charged carboxylate groups dominate in a weakly acidic environment with a pH value of about 5 [29,138]. Neutral pH values are most appropriate in the case of the encapsulation of living cells. Acid-tolerant cultures, such as lactic acid bacteria, can be immobilized in the lower pH range, down to 5 [139]. In the case of proteins, the isoelectric point must be taken into account [100].

In the case of the emulsification method/internal gelation, an important factor is the selection of the appropriate oil-soluble organic acid. There are many different oil-soluble organic acids that can be used, but acetic, citric and lactic acids are the most common ones [100]. The acid concentration must be carefully calculated to promote the release of calcium from the calcium complex without overdosing, otherwise it may potentially damage the enclosure [139].

5.6. Agitation Speed

In addition to the factors related to the composition of the reaction mixture, the technological parameters of the emulsification process also affect the quality of the microcapsules obtained. The literature sources indicate that increasing the mixing speed has a positive effect on reducing the size of microparticles. The high speed of mixing produces finer microparticles, which is related to greater energy that ensures the dispersion between the oil phase and the water phase in an emulsion [140]. The results of Ahmed et al. [141,142] indicate that the rotor speed was the most important parameter for controlling the size of the microparticles. It has been shown that increasing the agitation speed from 200 to 600 rpm generally reduces the size of the microspheres as they produce smaller emulsion droplets due to higher shear forces and increased turbulence in the emulsion. Similar conclusions have been presented by Rodrigues et al. [143], who prepared microspheres containing *Aeromonas hydrophila* bacteria using the emulsification technique/external gelation. As a result of increasing the rotation speed from 500 rpm to 2000 rpm, the average particle size decreased from 230 to 30.1 μm . Moreover, Alnaief et al. [122] made similar conclusions regarding the size of the microparticles. They explained that increasing the agitation speed from 200 to 1400 rpm gave a large energy input in order to create a larger interface area; thus, the dispersed droplets became finer and the microspheres were smaller in size. As reported by Shukla et al., who prepared alginate microspheres containing dioxanide furoate, using the emulsification technique/external gelation increased agitation speed

(750–1500 rpm) and had a positive effect on the reduction in microspheres (from 455.92 to 348.24 μm). However, when the mixing speed (1500 rpm) was too high, the formation of irregularly shaped microspheres occurred as an effect of particle aggregation [127,144,145]. Therefore, in order to obtain satisfactory results, it is necessary to select the value of the mixing rate individually, proper to each application.

5.7. Cross-Linking Time

Mali et al. drew attention to the effect of different cross-linking times on alginate microspheres loaded with domperidone prepared with the emulsification technique/external gelation. Their results show that increasing the gelation time from 5–15 min slightly increased the size (57.63–58.86 μm) of the alginate microspheres. However, it was found that with increasing cross-linking time, the encapsulation efficiency decreased (from 50.73% to 18.24%). This can be attributed to incomplete emulsification as a result of the higher viscosity of the internal aqueous phase [124]. Gedam et al. reached similar conclusions by preparing alginate microspheres filled with risedronate sodium using the emulsification technique/external gelation. As a result of increasing the cross-linking time from 5 to 10 min, the encapsulation efficiency decreased, and the size of the microparticles increased. Extended cross-linking time may be responsible for relatively greater cross-linking of sodium alginate guluronic acid units, which in turn could increase the viscosity of the preparation and cause the formation of larger microspheres [123,146]. On the other hand, too short cross-linking time may cause incomplete cross-linking of the alginate and, consequently, reduce the efficiency of encapsulation [29].

In turn, Lin et al. prepared alginate beads filled with astaxanthin using the extrusion technique. It was shown that with the increasing cross-linking time (from 15 to 60 min), no significant difference was observed, both in the mean bead size and the microencapsulation efficiency [127]. Similar conclusions were presented by Lotfipour et al. regarding the influence of mixing time on microencapsulation of bacteria with extrusion. Therefore, a short mixing time may not be sufficient to fully cross-link and generate intense electrolyte interactions. Consequently, larger particles with exposed pores are obtained, resulting in compound losses in the microparticle and reduced encapsulation efficiency [29,147,148]. On the other hand, if the mixing time is too long, it may increase the viscosity of the alginate phase, reduce the voids in the alginate matrix and increase the porosity and thus the leakage of active substance molecules from the alginate droplets to the medium [29,149,150].

6. Application of Alginate Microparticles

The AMP are very popular vehicles used for the encapsulation of active substances in food and pharmaceutical products (Tables 3 and 4). Primarily, the carriers were applied in the food industry and later on in pharmaceutical applications. In the case of cosmetics, alginate microparticles are not very popular yet, but as naturally originating, nontoxic, biodegradable and biocompatible systems, additionally showing a moisturizing and protective effect on skin, they have potential to grow their application [151].

6.1. The Application of AMP as Active Substance Carriers in the Food Industry

Alginates are very popular polymers in food industry. They are applied as thickening, gel-forming and stabilizing agents. Moreover, the alginate-based formulations, being biocompatible, biodegradable and nontoxic, are used as active compounds carriers.

With regard to the actives encapsulated in AMP, the probiotic micro-organisms are the most often entrapped [152–158]. The data collected in Table 3 show that the most common bacteria enclosed in alginate carriers are probiotics of the genus *Lactobacillus*, among others such as *L. plantarum*, *L. acidophilus* and *L. reuteri*. In the alginate systems, the probiotics have been incorporated into various formulations such as freeze-dried powders, tablets, pellets and microcapsules [159,160]. The microencapsulation process not only protects probiotics against unfavorable conditions in the digestive tract but also improves their viability and increases survival rate [30,152,161]. It should be underlined that the size of

probiotic bacteria usually ranges from 1 to 4 μm [162]. For such reason, it would not be possible to encapsulate them in nano-sized carriers.

Table 3. The application of alginate carriers in the food industry.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate chitosan calcium chloride	0.05 0.05 -	- - 0.0002	Nisin	Extrusion	[20]
sodium alginate guar gum calcium chloride	1.5–2.5 0.2–0.6 -	- - 0.1	Nisin	Extrusion	[163]
sodium alginate polyvinyl alcohol whey protein concentrate calcium chloride	31.2 31.2 18.8 5	- - - -	Sea buckthorn berries bio-oil and amaranth seeds bio-oil	Extrusion	[164]
sodium alginate calcium chloride fructooligosaccharides, isomaltoligosaccharides or peptide coated	1–3 - -	- - 0.1 -	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i> and <i>B. longum</i>	Extrusion	[165]
sodium alginate inulin or Jerusalem artichoke calcium chloride chitosan coated	3 3 - -	- - - 0.1 -	<i>L. acidophilus</i>	Extrusion	[152]
sodium alginate starch lecithin calcium chloride	2 2 0–4 -	- - - 0.1	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasperi</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. adolescenti</i> and <i>L. lactis</i>	Extrusion	[166]
sodium alginate xanthan gum fructose maltose glycerol calcium chloride	2 0.15 3 3 5.5 -	- - - - -	<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[167]
sodium alginate sugarbeet calcium chloride	2 2 -	- - 0.1	<i>Staphylococcus</i> <i>succinus</i> and <i>Enterococcus fecium</i>	Extrusion	[168]
sodium alginate calcium chloride	2 0.5	- -	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extrusion	[169]

Table 3. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate guar gum calcium chloride whey protein and chitosan coated	3 5 - 2	- - - 0.1	<i>Yarrowialipolytica</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> , <i>Saccharomyces fibuligera</i> and <i>Brettanomyces custersianus</i>	Extrusion	[170]
sodium alginate calcium chloride	1.875 -	- 1.5	<i>L. bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>	Extrusion	[171]
sodium alginate calcium chloride	1.875 -	- 1.5	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> and <i>Streptococcus cremoris</i>	Extrusion	[172]
sodium alginate calcium chloride	3 -	- 0.5	<i>L. reuteri</i> and <i>B. longum</i>	Extrusion	[173]
sodium alginate calcium chloride	1 -	- 0.1	<i>Streptococcus lactis</i> and <i>Streptococcus cremoris</i>	Extrusion	[174]
sodium alginate calcium chloride	0.75–2 -	- 0.1; 0.2; 1	<i>L. acidophilus</i>	Extrusion	[175]
sodium alginate locust bean gum xanthan gum calcium chloride chitosan coated	2 - - - -	- - - - 0.1	<i>L. rhamnosus</i>	Extrusion	[176]
sodium alginate calcium chloride	3 -	- 0.15	<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[177]
sodium alginate pancreatic digested casein fructooligosaccharides isomaltoligosaccharides calcium chloride	1–3 0–1 0–3 0–3 -	- - - - 1	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> and <i>B. bifidum</i>	Extrusion	[178]
sodium alginate calcium chloride	3 -	- 0.5	<i>L. reuteri</i>	Extrusion	[179]
sodium alginate calcium chloride	2 0.5; 0.8	- -	<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[180]
sodium alginate Hi-maize resistant starch calcium chloride	2 2 -	- - 0.1	<i>L. acidophilus</i>	Extrusion	[181]
sodium alginate fructooligosaccharides pancreatic digested casein calcium chloride	1–3 0–3 0–1 -	- - - 0.1	<i>B. bifidum</i>	Extrusion	[182]

Table 3. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate calcium chloride	3 -	- 0.5	<i>L. reuteri</i>	Extrusion	[183]
sodium alginate starch calcium chloride	2 2 -	- - 0.5	<i>L. reuteri</i>	Extrusion	[183]
sodium alginate glycerol xanthan gum Tween 20 calcium chloride chitosan coated	2 5 0.26 0.1 - 0.8	- - - - - 0.5	<i>L. bulgaricus</i>	Extrusion	[128]
sodium alginate calcium chloride	2 -	- 1	<i>L. acidophilus</i> and <i>B. bifidum</i>	Extrusion	[184]
sodium alginate or palmitoylated alginate calcium chloride	2 30	- -	<i>B. longum</i>	Extrusion	[185]
sodium alginate calcium chloride	1 -	- 0.1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Extrusion	[186]
sodium alginate glycerol xanthan gum calcium chloride chitosan or gelatin coated	1–3 5 0.9 - -	- - - - 1	<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[187]
sodium alginate calcium chloride	- 2	0.1 -	<i>L. acidophilus</i>	Extrusion	[188]
whey proteins concentrate sodium alginate calcium chloride	2.5–4 0.125 -	- - 0.1	<i>L. acidophilus</i>	Extrusion	[188]
sodium alginate whey protein isolate	- -	- -	<i>L. plantarum</i>	Spray-drying	[189]
sodium alginate calcium chloride	2 -	- 0.1	<i>L. rhamnosus</i>	Spray-drying	[190]
sodium alginate chitosan Tween 40 calcium chloride	1–2 - 0.5–1.5 -	- - - 0.5	Coriander essential oil	Emulsification (external gelation)	[97]

Table 3. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate and alginate-resistant starch	1		Nisin	Emulsification (external gelation)	[19]
sunflower oil	-	-			
Span 80	1	-			
Tween 80	1	-			
calcium chloride	25	-			
sodium alginate	2		Cocoa extract	Emulsification (internal gelation)	[131]
CaCO ₃	-				
Span 80	-				
polyglycerol polyricinoleate (PGPR)	4–15	-			
sunflower oil	-	-			
glacial acetic acid	-	-			
Tween 20	-	-			
calcium chloride	0.03–0.1	-			
sodium alginate	-		<i>L. acidophilus</i> and <i>L. rhamnosus</i>	Emulsification (external gelation)	[191]
vegetable oil	-	-			
Tween 80	-	-			
calcium chloride	-	0.0625			
sodium alginate	2		<i>L. acidophilus</i> and <i>Bifidobacterium</i> spp.	Emulsification (external gelation)	[83]
Hi-maize resistant starch	2	-			
Tween 80	0.02	-			
calcium chloride	-	0.1			
sodium alginate	3		<i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> and <i>B. bifidum</i>	Emulsification (external gelation)	[192]
guar gum	-				
xanthan gum	-				
locust bean gum	-	-			
carrageenan gum	-	-			
vegetable oil	-	-			
Tween 80	-	-			
calcium chloride	-	0.01			
sodium alginate	3		<i>L. acidophilus</i> and <i>L. casei</i>	Emulsification (external gelation)	[129]
Hi-maize resistant starch	2				
corn oil	-	-			
Tween 80	-	-			
calcium chloride	-	-			
chitosan coated	-	0.1			

Table 3. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate	1–3		<i>L. casei</i>	Emulsification (external gelation)	[133]
faxseed mucilage	0.9				
canola oil	-	-			
Tween 80	0.05	-			
calcium chloride	-	-			
		0.15			
sodium alginate	3.6		<i>L. bulgaricus</i>	Emulsification (external gelation)	[193]
vegetable oil	-	-			
Tween 80	2	-			
calcium chloride	-	-			
		0.05			
sodium alginate	2		<i>L. casei</i> and <i>B. lactis</i>	Emulsification (external gelation)	[194]
Hi-maize resistant starch	2				
canola oil	-	-			
lecithin	0.02	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	3		<i>L. reuteri</i>	Emulsification (external gelation)	[174]
corn oil	-	-			
Tween 80	0.02	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	2		<i>L. acidophilus</i> and <i>B. lactis</i>	Emulsification (external gelation)	[195]
Hi-maize starch	2	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	2–4		<i>L. casei</i>	Emulsification (external gelation)	[111]
soybean oil	-	-			
Tween 80	0.2	-			
calcium chloride	-	-			
		0.05			
sodium alginate	2		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Emulsification (internal gelation)	[196]
sodium citrate	0.1				
calcium citrate	1	-			
canola oil	-	-			
glacial acetic acid	0.667	-			
		-			
3% sodium alginate	3		<i>L. reuteri</i>	Emulsification (external gelation)	[183]
corn oil	-	-			
Tween 80	0.02	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	2		<i>L. reuteri</i>	Emulsification (external gelation)	[183]
starch	2				
corn oil	-	-			
Tween 80	0.02	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			

Table 3. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate	4		<i>L. acidophilus</i>	Emulsification (external gelation)	[197]
corn starch	2				
soybean oil	-	-			
Tween 80	-	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	1.5		<i>B. animalis subsp. lactis</i>	Emulsification (internal gelation)	[198]
CaCO ₃	-				
canola oil	-	-			
Tween 80	1.5	-			
glacial acetic acid	-	-			
		-			

6.2. The Application of AMP as Active Substance Carriers in the Pharmaceutical Industry

Alginate-based formulations as delivery systems have been originally developed for pharmaceutical applications to provide controlled release and improve the stability of drugs. Moreover, as in the case of food applications, the probiotic micro-organisms are mostly entrapped in such carriers (Table 4).

Table 4. The application of alginate carriers in the pharmaceutical industry.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate	2–4		Cellulase	Spray-drying	[70]
citric acid	0.6				
dicalcium phosphate	0.2	-			
succinic acid	4	-			
latex	0.05–0.5	-			
bovine serum albumin	0.15	-			
		-			
sodium alginate	3		Carvacrol	Spray-drying	[71]
pectin	3	-			
Tween 80	-	-			
		-			
sodium alginate	2	-	Insulin	Spray-drying	[72]
sodium alginate	4		Corn oil	Spray-drying	[69]
Tween 80	-	-			
succinic acid	2	-			
calcium phosphate dibasic dihydrate	0.2	-			
		-			
sodium alginate	2		Bovine serum albumin	Spray-drying	[25]
calcium chloride	2.5	-			
chitosan coated	-	-			
		-			

Table 4. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate	3		Catechin	Extrusion	[18]
sun flower oil	-	-			
oleic acid ester	1	-			
calcium chloride	4	-			
sodium alginate	0.5–2		α -tocopherol	Extrusion	[199]
pectin	2				
glycerol	1	-			
Tween 80	0.1	-			
calcium chloride	5	-			
sodium alginate	1		Invertase	Extrusion	[200]
calcium chloride	2.5	-			
sodium alginate	20		<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[201]
calcium chloride	-	-			
whey proteins coated	20	0.1			
sodium alginate	2		<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[202]
alginate/psyllium blend	1.5/0.5	-			
alginate/fenugreek blend	1.5/0.5	-			
calcium chloride	4	-			
xanthan gum	0.15		<i>L. plantarum</i>	Extrusion	[203]
sodium alginate	1.8				
Tween 80	1	-			
calcium chloride	-	-			
chitosan coated	-	0.1			
sodium alginate	2		<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> and <i>L. casei</i>	Extrusion	[204]
calcium chloride	-	-			
chitosan coated	-	0.1			
sodium alginate	2–4		<i>B. longum</i>	Extrusion	[205]
calcium chloride	-	0.1			
sodium alginate	1.8		<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>	Extrusion	[206]
calcium chloride	-	0.1			
sodium alginate	1.5		<i>L. reuteri</i>	Extrusion	[207]
calcium chloride	-	-			
poly-L-lysine and alginate coated	0.1 and 0.1	0.1			
sodium alginate	2		<i>L. fermentum</i>	Extrusion	[208]
oligosaccharides (GOS, FOS, IMO, XLO)	1.8	-			
calcium chloride	2	-			

Table 4. Cont.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate	1.4		<i>B. bifidum</i>	Extrusion	[209]
zein	1–9	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
sodium alginate	2		Testosterone	Emulsification (complexation)	[106]
Tween 80	-	-			
glycerol	-	-			
calcium chloride	-	-			
		2			
sodium alginate	0.3–0.6		Lemongrass oil and turmeric oil	Emulsification (complexation)	[107]
chitosan	0.3–0.6				
Tween 80	1	-			
ethanol	-	-			
calcium chloride	0.67	-			
		-			
sodium alginate	1.5		<i>B. longum</i>	Emulsification (internal gelation)	[84]
CaCO ₃	-				
soybean oil	-				
glacial acetic acid	-	0.000625			
Tween 80	1	-			
chitosan coated	0.4	-			
		-			
sodium alginate	1		<i>L. casei</i> and <i>B. bifidum</i>	Emulsification (external gelation)	[210]
corn starch	2				
vegetable oil	-	-			
Tween 80	0.2	-			
calcium chloride	-	-			
		0.1			
gelatin	13		<i>B. adolescentis</i>	Emulsification (external gelation)	[211]
genipin	-				
tempered oil	-				
Span 85	0.5	-			
calcium chloride	-	0.00125			
sodium alginate coated	1	-			
		0.05			
		-			

6.3. The Application of AMP as Active Substance Carriers in the Cosmetic Industry

In the case of cosmetics, alginate microparticles are not very popular yet, but as naturally originating systems additionally showing a moisturizing and protective effect on skin, their application is still growing. Currently, in the case of skin care products, AMP are used as carriers, both to protect unstable active compounds and to increase products' efficacy [212–215]. Additionally, AMP are used to enclosed unpleasant-smelling substances and, as a result, to obtain products with little odor or completely without it [214]. The examples of AMP cosmetic applications are presented in Table 5.

Table 5. The application of alginate carriers in the cosmetic industry.

Capsules Components	Concentration		Active Ingredients	Encapsulation Technique	References
	[%]	[M]			
sodium alginate Tween 20 calcium chloride	1–3 0.5; 2 2; 10	- - -	Astaxanthin	Extrusion	[127]
sodium alginate calcium chloride	- -	- -	Lactic acid bacteria (<i>Lactobacillus</i>)	Extrusion	[216]
sodium alginate solution ethanol Tween 80 calcium chloride	- - - -	- - - -	Tumeric oil	Emulsification	[217]
sodium alginate pectin Tween 80 calcium chloride	0.5–2.5 5 0.1 5	- - - -	Vitamin E	Emulsification	[218]

The data presented in Tables 3–5 show that extrusion, among others, is the most commonly used method for encapsulating substances in alginate systems, while the least used technique is spray drying. It is probably, due to the fact, that extrusion is a cheap method in which there is no need to use additional components, such as organic solvents, emulsifiers, or large amounts of oil.

Comparing the methods of probiotics microencapsulation (Tables 3–5), it is clear that extrusion is the most popular technique, probably because it does not damage bacteria cells and gives high probiotic viability. In turn, external gelation is the most frequently chosen method of emulsification process. This may be due to the fact that during external gelation, it is not necessary to use any additional acid, which could also cause interactions with microorganisms and, consequently, their reduced survival in microparticles.

6.4. Other AMP Applications

In recent years, the use of alginate microcapsules has been intensively developed in agriculture [219–221] for encapsulating plant-growth-promoting bacteria. Plants can grow better in the presence of plant probiotic bacteria because these bacteria carry out a number of various important functions, such as nitrogen fixation and mineral dissolution, among others. Other designs include the application of AMP as phase-change materials for thermal energy storage [222]. The urgent need to meet increasing energy demand and mitigate the environmental impact of fossil fuel combustion is driving large-scale research into efficient and sustainable methods of storing thermal energy. Among various technologies, systems using phase-change materials present one of the most promising strategies. Another potential application of alginate microparticles is metallic protection. The common application includes self-healing coatings for corrosion prevention in metal substrates. Hia et al. developed surface-modified alginate multicore microcapsules for metallic protection [223]. AMP are also used in the separation of metal ions, such as Mo(VI) [224], Sb(III) [225], Pu(IV) [226], Platinum Group Metals [227] and Cu²⁺ [228], among others, and for photocatalytic wastewater treatment [229].

6.5. Advantages and Disadvantages of Alginate Microparticles

The alginates used as raw material to obtain the microparticles show a lot of advantages but also a few disadvantages. Among the advantages of using AMP as a carrier of active compounds, it should be mentioned that:

- Alginates form a highly versatile, biocompatible, biodegradable and nontoxic matrix, effectively protecting active components against external factors such as heat and moisture, thereby enhancing stability and bioavailability [131,152,200];

- Alginates show a prebiotic effect of low molecular weight alginates and their ability to extend the product shelf life [131,230] of beverages [231], yoghurt [232], sausages [233,234], tuna burgers [235], cheese [236], apple juice [237] and ice-cream [238], among others;
- There are mild microencapsulation conditions and no high temperatures (emulsification and extrusion), which is especially important in the case of the encapsulation of bacteria [200], because they are very sensitive to high temperatures;
- Alginates form highly stable particles in the spray-drying technique [70], however, the use of high temperatures in this method when encapsulating probiotics may reduce their effectiveness and number [153];
- Alginates improve the stability and increase the efficiency of delivery to the body of microencapsulated active compounds [72], including probiotic microorganisms;
- Alginates protect bacterial cells against the external environment [152], reduce susceptibility to contamination and protect against damage [205], such as the presence of gastric juices, acidity and low pH [239,240], and in the case of cosmetics, protect probiotics against the effects of preservatives;
- Alginates increase the survival of probiotic bacteria both in the product and in the gastrointestinal tract [165,168,191], which allows them to reach the intestines, and thus has a positive effect on the intestinal microbiome [241,242].

On the other hands, among the disadvantages of AMP, attention should be paid to:

- The low efficiency of capsules loaded with bacteria, difficulties in application on an industrial scale due to the high cost of bacteria and the microencapsulation techniques [72];
- Susceptibility to the acidic environment of AMP loaded with bacteria, which reduces the efficiency of encapsulation, such as a result of gastric juices [133,201,243];
- The low mechanical strength of AMP and large pore size, which may cause the leakage of biomolecules from microcapsules [200,244,245];

These disadvantages can be overcome, and the encapsulation efficiency can be increased by using a coating material, e.g., chitosan [152], a peptide or fructooligosaccharides [165].

7. Summary

The manuscript presents a review of the current state of alginate polymer applications in the form of alginate microparticles (AMP) in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The most important properties of alginates, including safety and biocompatibility, were described. The AMP preparation methods, their characteristics and industrial applications were discussed. This overview provides an understanding of encapsulation techniques (such as extrusion, emulsification and spray-drying processes) and the process parameters that are critical to microcapsules production and affect particle size, morphology and encapsulation efficiency. The influence of the microencapsulation process parameters on microparticle quality was discussed. Finally, a summary of the active compounds encapsulated in the alginate carriers was presented, and the advantages and some disadvantages of the alginate particles as delivery systems were summarized.

It was shown that alginate as natural biopolymer forms a highly versatile, biocompatible, biodegradable and nontoxic matrix, effectively protecting the active components against external factors, and thereby enhancing their stability and bioavailability. However, there are only few studies devoted to the use of alginate capsules as carriers of active substances in cosmetic products, despite the fact that alginate carriers can be an ideal solution, especially as probiotic carriers, in the case of skin-microbiome-friendly cosmetics.

In addition, given the various applications in which AMP are already used for due to their attractive physicochemical properties and the continuously evolving methods of producing them, alginates will make a significant contribution to revolutionizing research in the future.

Another future interest is the development of the alginate microencapsulation techniques. The upcoming process for the production of microcapsules and microspheres, with great potential also in alginate microcapsule production, is the microfluidic technique. The process allows the preparation of microgels with a wide range of morphologies and

allows the continuous fine-tuning of the shape of the microparticles by simply changing the gelation conditions, e.g., the viscosity of the gelation bath, collecting height or interfacial tension [246,247].

Author Contributions: A.L., M.M. and E.S.—conceptualization; A.L., M.M. and E.S. —writing—original draft preparation; A.L.—writing—review and editing; A.L.—visualization; M.M. and E.S.—supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Campos, E.; Branquinho, J.; Carreira, A.S.; Carvalho, A.; Coimbra, P.; Ferreira, P.; Gil, M.H. Designing Polymeric Microparticles for Biomedical and Industrial Applications. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2005–2021. [\[CrossRef\]](#)
2. Vilos, C.; Velasquez, L.A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 672760. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Solanki, H.K.; Pawar, D.D.; Shah, D.A.; Prajapati, V.D.; Jani, G.K.; Mulla, A.M.; Thakar, P.M. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 620719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Paques, J.P.; Van Der Linden, E.; Van Rijn, C.J.M.; Sagis, L.M.C. Preparation Methods of Alginate Nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *209*, 163–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A.J.; Antal, I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Sci. Pharm.* **2019**, *87*, 20. [\[CrossRef\]](#)
6. Coelho, J.F.; Ferreira, P.C.; Alves, P.; Cordeiro, R.; Fonseca, A.C.; Góis, J.R.; Gil, M.H. Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments. *EPMA J.* **2010**, *1*, 164–209. [\[CrossRef\]](#)
7. Matricardi, P.; Di Meo, C.; Coviello, T.; Alhaique, F. Recent Advances and Perspectives on Coated Alginate Microspheres for Modified Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 417–425. [\[CrossRef\]](#)
8. Teoh, P.L.; Mirhosseini, H.; Mustafa, S.; Hussin, A.S.M.; Manap, M.Y.A. Recent Approaches in the Development of Encapsulated Delivery Systems for Probiotics. *Food Biotechnol.* **2011**, *25*, 77–101. [\[CrossRef\]](#)
9. Wang, B.; Hu, L.; Siahaan, T.J. *Drug Delivery: Principles and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2016. [\[CrossRef\]](#)
10. Park, J.H.; Ye, M.; Park, K. Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs. *Molecules* **2005**, *10*, 146–161. [\[CrossRef\]](#)
11. Gasperini, L.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Natural Polymers for the Microencapsulation of Cells. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140817. [\[CrossRef\]](#)
12. Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Iemma, F.; Puoci, F.; Cirillo, G.; Parisi, O.I.; Picci, N. Grafted Thermo-Responsive Gelatin Microspheres as Delivery Systems in Triggered Drug Release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *76*, 48–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ammar, H.O.; Ghorab, M.; Kamel, R.; Salama, A.H. A Trial for the Design and Optimization of PH-Sensitive Microparticles for Intestinal Delivery of Cinnarizine. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2016**, *6*, 195–209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kumar, A.; Montemagno, C.; Choi, H.J. Smart Microparticles with a PH-Responsive Macropore for Targeted Oral Drug Delivery. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tyle, P. Effect of Size, Shape and Hardness of Particles in Suspension on Oral Texture and Palatability. *Acta Psychol.* **1993**, *84*, 111–118. [\[CrossRef\]](#)
16. Leon, A.M.; Medina, W.T.; Park, D.J.; Aguilera, J.M. Mechanical Properties of Whey Protein/Na Alginate Gel Microparticles. *J. Food Eng.* **2016**, *188*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
17. Leon, A.M.; Medina, W.T.; Park, D.J.; Aguilera, J.M. Properties of Microparticles from a Whey Protein Isolate/Alginate Emulsion Gel. *Food Sci. Technol. Int.* **2018**, *24*, 414–423. [\[CrossRef\]](#)
18. Kim, E.S.; Lee, J.S.; Lee, H.G. Calcium-Alginate Microparticles for Sustained Release of Catechin Prepared via an Emulsion Gelation Technique. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1337–1343. [\[CrossRef\]](#)
19. Hosseini, S.M.; Hosseini, H.; Mohammadifar, M.A.; German, J.B.; Mortazavian, A.M.; Mohammadi, A.; Khosravi-Darani, K.; Shojae-Aliabadi, S.; Khaksar, R. Preparation and Characterization of Alginate and Alginate-Resistant Starch Microparticles Containing Nisin. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103*, 573–580. [\[CrossRef\]](#)
20. Chandrasekar, V.; Coupland, J.N.; Anantheswaran, R.C. Characterization of Nisin Containing Chitosan-Alginate Microparticles. *Food Hydrocoll.* **2017**, *69*, 301–307. [\[CrossRef\]](#)

21. Cheng, S.Y.; Yuen, M.C.W.; Kan, C.W.; Cheuk, K.K.L.; Chui, C.H.; Lam, K.H. Cosmetic Textiles with Biological Benefits: Gelatin Microcapsules Containing Vitamin C. *Int. J. Mol. Med.* **2009**, *24*, 411–419. [\[CrossRef\]](#)
22. Chelaru, C.; Ignat, M.; Albu, M.; Meghea, A. Polymeric Microcapsules for Cosmetic Applications, Based on Lemon Essential Oil (*Citrus limon*). *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.* **2015**, *77*, 101–112.
23. Yingngam, B.; Kacha, W.; Rungseevijitprapa, W.; Sudta, P.; Prasitpuriprecha, C.; Brantner, A. Response Surface Optimization of Spray-Dried Citronella Oil Microcapsules with Reduced Volatility and Irritation for Cosmetic Textile Uses. *Powder Technol.* **2019**, *355*, 372–385. [\[CrossRef\]](#)
24. Tran, V.T.; Benoit, J.P.; Venier-Julienne, M.C. Why and How to Prepare Biodegradable, Monodispersed, Polymeric Microparticles in the Field of Pharmacy? *Int. J. Pharm.* **2011**, *407*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
25. Coppi, G.; Iannuccelli, V.; Leo, E.; Bernabei, M.T.; Cameroni, R. Chitosan-Alginate Microparticles as a Protein Carrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 393–400. [\[CrossRef\]](#)
26. Coppi, G.; Iannuccelli, V.; Leo, E.; Bernabei, M.T.; Cameroni, R. Protein Immobilization in Crosslinked Alginate Microparticles. *J. Microencapsul.* **2002**, *19*, 37–44. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Agüero, L.; Zaldivar-Silva, D.; Peña, L.; Dias, M. Alginate Microparticles as Oral Colon Drug Delivery Device: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *168*, 32–43. [\[CrossRef\]](#)
28. Puscaselu, R.G.; Lobiuc, A.; Dimian, M.; Covasa, M. Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers* **2020**, *12*, 2417. [\[CrossRef\]](#)
29. Choukaife, H.; Doolaanea, A.A.; Alfatama, M. Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 335. [\[CrossRef\]](#)
30. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S.V. Technology and Potential Applications of Probiotic Encapsulation in Fermented Milk Products. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4679–4696. [\[CrossRef\]](#)
31. Yang, M.; Liang, Z.; Wang, L.; Qi, M.; Luo, Z.; Li, L. Microencapsulation Delivery System in Food Industry-Challenge and the Way Forward. *Adv. Polym. Technol.* **2020**, *2020*, 7531810. [\[CrossRef\]](#)
32. Dhamecha, D.; Movsas, R.; Sano, U.; Menon, J.U. Applications of Alginate Microspheres in Therapeutics Delivery and Cell Culture: Past, Present and Future. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Martau, G.A.; Mihai, M.; Vodnar, D.C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector: Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers* **2019**, *11*, 1837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Wang, B.; Wan, Y.; Zheng, Y.; Lee, X.; Liu, T.; Yu, Z.; Huang, J.; Ok, Y.S.; Chen, J.; Gao, B. Alginate-Based Composites for Environmental Applications: A Critical Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 318–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tønnesen, H.H.; Karlsen, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 621–630. [\[CrossRef\]](#)
36. Gomathi, T.; Susi, S.; Abirami, D.; Sudha, P.N. Size Optimization And Thermal Studies on Calcium Alginate Nanoparticles. *IOSR J. Pharm.* **2017**, *48*, 1–7.
37. Van Vlierberghe, S.; Graulus, G.J.; Samal, S.K.; Van Nieuwenhove, I.; Dubruel, P. Porous Hydrogel Biomedical Foam Scaffolds for Tissue Repair. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*; Woodhead Publishing Limited: Thorston, UK, 2014; pp. 335–390. [\[CrossRef\]](#)
38. Wyreńska, Ł.; Szuster, L.; Stawska, H. Synteza i Aplikacja Nowych Pochodnych Wybranych Polisacharydów Część I: Przegląd Literatury. *Technol. i Jakość Wyr.* **2014**, *59*, 3–16.
39. Asgari, S.; Pourjavadi, A.; Licht, T.R.; Boisen, A.; Ajallouei, F. Polymeric Carriers for Enhanced Delivery of Probiotics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *161*–162, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
40. El Din, K.S. Deposition and Structural Formation of 3D Alginate Tissue Scaffolds. Ph.D. Thesis, Drexel University, Philadelphia, PA, USA, 2005.
41. Walczak, J.; Marchewka, J.; Laska, J. Hydrożele Alginianowe Sיעiowane Jonowo i Kowalencyjnie. *Eng. Biomater.* **2015**, *18*, 17–23.
42. Paques, J.P. Formation of Alginate Nanospheres. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Wageningen, NL, USA, 2014.
43. Kim, S.; Jeong, C.; Cho, S.; Kim, S.B. Effects of Thermal Treatment on the Physical Properties of Edible Calcium Alginate Gel Beads: Response Surface Methodological Approach. *Foods* **2019**, *8*, 578. [\[CrossRef\]](#)
44. Jarmoluk, A.; Wrzeszcz, K.; Zimoch, A.; Marycz, K. Sיעiowanie Alginianu Sodiu Do Hydrożeli Dla Inżynierii Tkankowej. *Przem. Chem.* **2013**, *92*, 1018–1022.
45. Gombotz, W.R.; Wee, S.F. Protein Release from Alginate Matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 194–205. [\[CrossRef\]](#)
46. Cook, M.T.; Tzortzis, G.; Charalampopoulos, D.; Khutoryanskiy, V.V. Microencapsulation of Probiotics for Gastrointestinal Delivery. *J. Control. Release* **2012**, *162*, 56–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Emmerichs, N.; Wingender, J.; Flemming, H.C.; Mayer, C. Interaction between Alginates and Manganese Cations: Identification of Preferred Cation Binding Sites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 73–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Tu, J.; Bolla, S.; Barr, J.; Miedema, J.; Li, X.; Jasti, B. Alginate Microparticles Prepared by Spray-Coagulation Method: Preparation, Drug Loading and Release Characterization. *Int. J. Pharm.* **2005**, *303*, 171–181. [\[CrossRef\]](#)
49. Gbassi, G.K.; Vandamme, T. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics* **2012**, *4*, 149–163. [\[CrossRef\]](#)
50. Keyan, K.; Ramachandran, T.; Shumugasundaram, O.L.; Balasubramaniam, M.; Ragavendra, T. Microencapsulation of PCMs in Textiles: A Review. *J. Text. Apparel Technol. Manag.* **2012**, *7*, 1–10.

51. Devi, N.; Sarmah, M.; Khatun, B.; Maji, T.K. Encapsulation of Active Ingredients in Polysaccharide–Protein Complex Coacervates. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *239*, 136–145. [\[CrossRef\]](#)
52. Avula, B.; Parveen, I.; Zhao, J.; Wang, M.; Tehen, N.; Wang, Y.H.; Riaz, M.; Bae, J.Y.; Shami, A.A.; Chittiboyina, A.G.; et al. A Comprehensive Workflow for the Analysis of Bio-Macromolecular Supplements: Case Study of 20 Whey Protein Products. *J. Diet. Suppl.* **2022**, *19*, 515–533. [\[CrossRef\]](#)
53. Drobnik, J. Biodegradable Soluble Macromolecules as Drug Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1989**, *3*, 229–245. [\[CrossRef\]](#)
54. Kiyohara, H.; Nonaka, K.; Sekiya, M.; Matsumoto, T.; Nagai, T.; Tabuchi, Y.; Yamada, H. Polysaccharide-Containing Macromolecules in a Kampo (Traditional Japanese Herbal) Medicine, Hochuekkito: Dual Active Ingredients for Modulation of Immune Functions on Intestinal Peyer's Patches and Epithelial Cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2011**, *2011*, 492691. [\[CrossRef\]](#)
55. Sharma, N.; Sharma, A.; Bhatnagar, A.; Nishad, D.; Karwasra, R.; Khanna, K.; Sharma, D.; Kumar, N.; Jain, G.K. Novel Gum Acacia Based Macroparticles for Colon Delivery of Mesalazine: Development and Gammascintigraphy Study. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *54*, 101224. [\[CrossRef\]](#)
56. MacEwan, S.R.; Callahan, D.J.; Chilkoti, A. Stimulus-Responsive Macromolecules and Nanoparticles for Cancer Drug Delivery. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 793–806. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Kaurav, H.; Hari Kumar, S.L.; Kaur, A. Mucoadhesive Microspheres as Carriers in Drug Delivery: A Review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **2012**, *4*, 21–34.
58. Gurung, B.D.; Kakar, S. An Overview on Microspheres. *Int. J. Health Clin. Res.* **2020**, *3*, 11–24.
59. Popović, D.A.; Milinčić, D.D.; Pešić, M.B.; Kalušević, A.M.; Tešić, Ž.L.; Nedović, V.A. Encapsulation Technologies for Polyphenol-Loaded Microparticles in Food Industry. In *Green Food Processing Techniques*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 335–367. [\[CrossRef\]](#)
60. Tiloke, C.; Phulukdaree, A.; Chuturgoon, A.A. The Chemotherapeutic Potential of Gold Nanoparticles Against Human Carcinomas: A Review. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 3–31. [\[CrossRef\]](#)
61. Tyagi, V.V.; Kaushik, S.C.; Tyagi, S.K.; Akiyama, T. Development of Phase Change Materials Based Microencapsulated Technology for Buildings: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15*, 1373–1391. [\[CrossRef\]](#)
62. Baranauskaitė, J.; Ockun, M.A.; Uner, B.; Tas, C.; Ivanauskas, L. Effect of the Amount of Polysorbate 80 and Oregano Essential Oil on the Emulsion Stability and Characterization Properties of Sodium Alginate Microcapsules. *Molecules* **2021**, *26*, 6304. [\[CrossRef\]](#)
63. Ozkan, G.; Franco, P.; De Marco, I.; Xiao, J.; Capanoglu, E. A Review of Microencapsulation Methods for Food Antioxidants: Principles, Advantages, Drawbacks and Applications. *Food Chem.* **2019**, *272*, 494–506. [\[CrossRef\]](#)
64. Percy, S.R. Improvement in Drying and Concentrating Liquid Substances by Atomizing. US Patent No. 125406, 1872.
65. Piñón-Balderrama, C.I.; Leyva-Porras, C.; Terán-Figueroa, Y.; Espinosa-Solis, V.; Álvarez-Salas, C.; Saavedra-Leos, M.Z. Encapsulation of Active Ingredients in Food Industry by Spray-Drying and Nano Spray-Drying Technologies. *Processes* **2020**, *8*, 889. [\[CrossRef\]](#)
66. Keshani, S.; Daud, W.R.W.; Nourouzi, M.M.; Namvar, F.; Ghasemi, M. Spray Drying: An Overview on Wall Deposition, Process and Modeling. *J. Food Eng.* **2015**, *146*, 152–162. [\[CrossRef\]](#)
67. Martin, M.J.; Lara-Villoslada, F.; Ruiz, M.A.; Morales, M.E. Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *27*, 15–25. [\[CrossRef\]](#)
68. Kailasapathy, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2002**, *3*, 39–48. [\[PubMed\]](#)
69. Strobel, S.A.; Scher, H.B.; Nitin, N.; Jeoh, T. In Situ Cross-Linking of Alginate during Spray-Drying to Microencapsulate Lipids in Powder. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 141–149. [\[CrossRef\]](#)
70. Santa-Maria, M.; Scher, H.; Jeoh, T. Microencapsulation of Bioactives in Cross-Linked Alginate Matrices by Spray Drying. *J. Microencapsul.* **2012**, *29*, 286–295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Sun, X.; Cameron, R.G.; Bai, J. Effect of Spray-Drying Temperature on Physicochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Pectin/Sodium Alginate Microencapsulated Carvacrol. *Food Hydrocoll.* **2020**, *100*, 105420. [\[CrossRef\]](#)
72. Bowey, K.; Swift, B.E.; Flynn, L.E.; Neufeld, R.J. Characterization of Biologically Active Insulin-Loaded Alginate Microparticles Prepared by Spray Drying. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 457–465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. King, A.H. Encapsulation of Food Ingredients. A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. *ACS Symp. Ser.* **1995**, *590*, 26–39.
74. Heidebach, T.; Först, P.; Kulozik, U. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 291–311. [\[CrossRef\]](#)
75. Gouin, S. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 330–347. [\[CrossRef\]](#)
76. Kailasapathy, K. Encapsulation Technologies for Functional Foods and Nutraceutical Product Development. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **2009**, *4*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
77. de Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 292–302. [\[CrossRef\]](#)
78. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 3–13. [\[CrossRef\]](#)

79. Mortazavian, A.; Razavi, S.H.; Ehsani, M.R.; Sohrabvandi, S. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. *Iran. J. Biotechnol.* **2007**, *5*, 1–18.
80. Groboillot, A.F.; Champagne, C.P.; Darling, G.D.; Poncelet, D.; Neufeld, R.J. Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 1157–1163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Shima, M.; Morita, Y.; Yamashita, M.; Adachi, S. Protection of *Lactobacillus Acidophilus* from the Low PH of a Model Gastric Juice by Incorporation in a W/O/W Emulsion. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 1164–1169. [\[CrossRef\]](#)
82. Mortazavian, A.M.; Ehsani, M.R.; Azizi, A.; Razavi, S.H.; Mousavi, S.M.; Sohrabvandi, S.; Reinheimer, J.A. Viability of Calcium-Alginate-Microencapsulated Probiotic Bacteria in Iranian Yogurt Drink (Doogh) during Refrigerated Storage and under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Aust. J. Dairy Technol.* **2008**, *63*, 25–30.
83. Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Peiris, P.; Kailasapathy, K. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *62*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
84. Ji, R.; Wu, J.; Zhang, J.; Wang, T.; Zhang, X.; Shao, L.; Chen, D.; Wang, J. Extending Viability of *Bifidobacterium Longum* in Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Using Emulsification and Internal Gelation Encapsulation Technology. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1389. [\[CrossRef\]](#)
85. Kearney, L.; Upton, M.; McLoughlin, A. Enhancing the Viability of *Lactobacillus Plantarum* Inoculum by Immobilizing the Cells in Calcium-Alginate Beads Incorporating Cryoprotectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 3112–3116. [\[CrossRef\]](#)
86. Gentile, F.T.; Doherty, E.J.; Rein, D.H.; Shoichet, M.S.; Winn, S.R. Reactive Polymers Polymer Science for Macroencapsulation of Cells for Central Nervous System Transplantation. *React. Polym.* **1995**, *25*, 207–227. [\[CrossRef\]](#)
87. Pupa, P.; Apiwatsiri, P.; Sirichokchatchawan, W.; Pirarat, N.; Muangsins, N.; Shah, A.A.; Prapasarakul, N. The Efficacy of Three Double-Microencapsulation Methods for Preservation of Probiotic Bacteria. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13753. [\[CrossRef\]](#)
88. Przybysławska, M.; Winnicka, K. Technologie Otrzymywania Mikro kapsulek. *Farm. Pol.* **2012**, *68*, 283–289. Available online: <https://www.ptfarm.pl/en/wydawnictwa/czasopisma/farmacja-polska/103/-/14209> (accessed on 22 August 2022).
89. Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. Flavour Encapsulation and Controlled Release-A Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *41*, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
90. Dong, Q.Y.; Chen, M.Y.; Xin, Y.; Qin, X.Y.; Cheng, Z.; Shi, L.E.; Tang, Z.X. Alginate-Based and Protein-Based Materials for Probiotics Encapsulation: A Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 1339–1351. [\[CrossRef\]](#)
91. Chan, L.W.; Lee, H.Y.; Heng, P.W.S. Mechanisms of External and Internal Gelation and Their Impact on the Functions of Alginate as a Coat and Delivery System. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63*, 176–187. [\[CrossRef\]](#)
92. Liu, X.; Xue, W.; Liu, Q.; Yu, W.; Fu, Y.; Xiong, X.; Ma, X.; Yuan, Q. Swelling Behaviour of Alginate-Chitosan Microcapsules Prepared by External Gelation or Internal Gelation Technology. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *56*, 459–464. [\[CrossRef\]](#)
93. Quong, D.; Neufeld, R.J.; Skjåk-Bræk, G.; Poncelet, D. External versus Internal Source of Calcium during the Gelation of Alginate Beads for DNA Encapsulation. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 438–446. [\[CrossRef\]](#)
94. Liu, X.D.; Yu, W.Y.; Zhang, Y.; Xue, W.M.; Yu, W.T.; Xiong, Y.; Ma, X.J.; Chen, Y.; Yuan, Q. Characterization of Structure and Diffusion Behaviour of Ca-Alginate Beads Prepared with External or Internal Calcium Sources. *J. Microencapsul.* **2002**, *19*, 775–782. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Kakkamani, G.; Cheneler, D.; Grover, L.M.; Adams, M.J.; Bowen, J. Mechanical Properties of Alginate Hydrogels Manufactured Using External Gelation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, *36*, 135–142. [\[CrossRef\]](#)
96. Mahdi, M.H.; Diryak, R.; Kontogiorgos, V.; Morris, G.A.; Smith, A.M. In Situ Rheological Measurements of the External Gelation of Alginate. *Food Hydrocoll.* **2016**, *55*, 77–80. [\[CrossRef\]](#)
97. Dima, C.; Gitin, L.; Alexe, P.; Dima, S. Encapsulation of Coriander Essential Oil in Alginate and Alginate/Chitosan Microspheres by Emulsification External Gelation Method. *Insid. Food Symp.* **2013**, *9*, 1–6.
98. Paques, J.P. Alginate Nanospheres Prepared by Internal or External Gelation with Nanoparticles. In *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 39–55. [\[CrossRef\]](#)
99. Leong, J.Y.; Lam, W.H.; Ho, K.W.; Voo, W.P.; Lee, M.F.X.; Lim, H.P.; Lim, S.L.; Tey, B.T.; Poncelet, D.; Chan, E.S. Advances in Fabricating Spherical Alginate Hydrogels with Controlled Particle Designs by Ionotropic Gelation as Encapsulation Systems. *Particuology* **2016**, *24*, 44–60. [\[CrossRef\]](#)
100. Reis, C.P.; Neufeld, R.J.; Vilela, S.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Review and Current Status of Emulsion/Dispersion Technology Using an Internal Gelation Process for the Design of Alginate Particles. *J. Microencapsul.* **2006**, *23*, 245–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Baek, S.; Joo, S.H.; Toborek, M. Treatment of Antibiotic-Resistant Bacteria by Encapsulation of ZnO Nanoparticles in an Alginate Biopolymer: Insights into Treatment Mechanisms. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *373*, 122–130. [\[CrossRef\]](#)
102. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [\[CrossRef\]](#)
103. Ahmadi, M.; Madrakian, T.; Ghavami, S. *Preparation and Characterization of Simvastatin Nanocapsules: Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Calcium Alginate*. *Methods in Molecular Biology*; Humana: New York, NY, USA, 2018; pp. 47–56. [\[CrossRef\]](#)
104. Šafaříková, M.; Roy, I.; Gupta, M.N.; Šafařík, I. Magnetic Alginate Microparticles for Purification of α -Amylases. *J. Biotechnol.* **2003**, *105*, 255–260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Lertsutthiwong, P.; Noomun, K.; Jongaroonngamsang, N.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U. Preparation of Alginate Nanocapsules Containing Turmeric Oil. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 209–214. [\[CrossRef\]](#)

106. Bhowmik, B.B.; Sa, B.; Mukherjee, A. Preparation and in Vitro Characterization of Slow Release Testosterone Nanocapsules in Alginates. *Acta Pharm.* **2006**, *56*, 417–429.
107. Natrajan, D.; Srinivasan, S.; Sundar, K.; Ravindran, A. Formulation of Essential Oil-Loaded Chitosan-Alginate Nanocapsules. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 560–568. [\[CrossRef\]](#)
108. Dubashynskaya, N.V.; Petrova, V.A.; Romanov, D.P.; Skorik, Y.A. PH-Sensitive Drug Delivery System Based on Chitin Nanowhiskers–Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex. *Materials* **2022**, *15*, 5860. [\[CrossRef\]](#)
109. Chan, E.S.; Lim, T.K.; Voo, W.P.; Pogaku, R.; Tey, B.T.; Zhang, Z. Effect of Formulation of Alginate Beads on Their Mechanical Behavior and Stiffness. *Particuology* **2011**, *9*, 228–234. [\[CrossRef\]](#)
110. Liu, X.D.; Bao, D.C.; Xue, W.M.; Xiong, Y.; Yu, W.T.; Yu, X.J.; Ma, X.J.; Yuan, Q. Preparation of Uniform Calcium Alginate Gel Beads by Membrane Emulsification Coupled with Internal Gelation. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *87*, 848–852. [\[CrossRef\]](#)
111. Mandal, S.; Puniya, A.K.; Singh, K. Effect of Alginate Concentrations on Survival of Microencapsulated Lactobacillus Casei NCDC-298. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1190–1195. [\[CrossRef\]](#)
112. Lotfipour, F.; Mirzaei, S.; Maghsoodi, M. Evaluation of the Effect of CaCl₂ and Alginate Concentrations and Hardening Time on the Characteristics of Lactobacillus Acidophilus Loaded Alginate Beads Using Response Surface Analysis. *Adv. Pharm. Bull.* **2012**, *2*, 71–78. [\[CrossRef\]](#)
113. Zhang, H.; Cheng, J.; Ao, Q. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 264. [\[CrossRef\]](#)
114. Li, L.; Fang, Y.; Vreeker, R.; Appelqvist, I.; Mendes, E. Reexamining the Egg-Box Model in Calcium-Alginate Gels with X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 464–468. [\[CrossRef\]](#)
115. Harper, B.A.; Barbut, S.; Lim, L.T.; Marcone, M.F. Effect of Various Gelling Cations on the Physical Properties of “Wet” Alginate Films. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, 562–567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Mu, B.; Lu, C.; Liu, P. Disintegration-Controllable Stimuli-Responsive Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules via Covalent Layer-by-Layer Assembly. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *82*, 385–390. [\[CrossRef\]](#)
117. Merakchi, A.; Bettayeb, S.; Drouiche, N.; Adour, L.; Lounici, H. Cross-Linking and Modification of Sodium Alginate Biopolymer for Dye Removal in Aqueous Solution. *Polym. Bull.* **2019**, *76*, 3535–3554. [\[CrossRef\]](#)
118. Kesselman, L.R.B.; Shinwary, S.; Selvaganapathy, P.R.; Hoare, T. Synthesis of Monodisperse, Covalently Cross-Linked, Degradable “Smart” Microgels Using Microfluidics. *Small* **2012**, *8*, 1092–1098. [\[CrossRef\]](#)
119. Yang, L.; Ma, X.; Guo, N. Sodium Alginate/Na⁺-Rectorite Composite Microspheres: Preparation, Characterization, and Dye Adsorption. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 853–858. [\[CrossRef\]](#)
120. Won, K.; Kim, S.; Kim, K.J.; Park, H.W.; Moon, S.J. Optimization of Lipase Entrapment in Ca-Alginate Gel Beads. *Process. Biochem.* **2005**, *40*, 2149–2154. [\[CrossRef\]](#)
121. Esquisabel, A.; Hernandez, R.M.; Igartua, M.; Gascon, A.R.; Calvo, B.; Pedraz, J.L. Effect of Lecithins on BCG-Alginate-PLL Microcapsule Particle Size and Stability upon Storage. *J. Microencapsul.* **2000**, *17*, 363–372. [\[CrossRef\]](#)
122. Alnaief, M.; Alzaitoun, M.A.; García-González, C.A.; Smirnova, I. Preparation of Biodegradable Nanoporous Microspherical Aerogel Based on Alginate. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84*, 1011–1018. [\[CrossRef\]](#)
123. Gedam, S.; Jadhav, P.; Talele, S.; Jadhav, A. Effect of Crosslinking Agent on Development of Gastroretentive Mucoadhesive Microspheres of Risedronate Sodium. *Int. J. Appl. Pharm.* **2018**, *10*, 133–140. [\[CrossRef\]](#)
124. Mali, K.K.; Dias, R.J.; Ghorpade, V.S.; Havaladar, V.D. Sodium Alginate Microspheres Containing Multicomponent Inclusion Complex of Domperidone. *Lat. Am. J. Pharm.* **2010**, *29*, 1199–1207.
125. Lemoine, D.; Wauters, F.; Bouchend’homme, S.; Pr  at, V. Preparation and Characterization of Alginate Microspheres Containing a Model Antigen. *Int. J. Pharm.* **1998**, *176*, 9–19. [\[CrossRef\]](#)
126. Chan, L.W.; Lee, H.Y.; Heng, P.W.S. Production of Alginate Microspheres by Internal Gelation Using an Emulsification Method. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 259–262. [\[CrossRef\]](#)
127. Lin, S.; Chen, Y.; Chen, R.; Chen, L.; Ho, H. Improving the Stability of Astaxanthin by Microencapsulation in Calcium Alginate Beads. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153685. [\[CrossRef\]](#)
128. Lee, J.S.; Cha, D.S.; Park, H.J. Survival of Freeze-Dried Lactobacillus Bulgaricus KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7300–7305. [\[CrossRef\]](#)
129. Seyedain-Ardabili, M.; Sharifan, A.; Tarzi, B.G. The Production of Synbiotic Bread by Microencapsulation. *Food Technol. Biotechnol.* **2016**, *54*, 52–59. [\[CrossRef\]](#)
130. Ribeiro, A.J.; Neufeld, R.J.; Arnaud, P.; Chaumeil, J.C. Microencapsulation of Lipophilic Drugs in Chitosan-Coated Alginate Microspheres. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 115–123. [\[CrossRef\]](#)
131. Lupo, B.; Maestro, A.; Porras, M.; Gutiérrez, J.M.; González, C. Preparation of Alginate Microspheres by Emulsification/Internal Gelation to Encapsulate Cocoa Polyphenols. *Food Hydrocoll.* **2014**, *38*, 56–65. [\[CrossRef\]](#)
132. Price, R.; Monshipouri, M. Internal Gelation Methodmfor Forming Multilayer Microspheres and Product Thereof. U.S. Patent No. 5,744,337, 28 April 1998.
133. Shafizadeh, A.; Golestan, L.; Ahmadi, M.; Darjani, P.; Ghorbani, A. Encapsulation of Lactobacillus Casei in Alginate Microcapsules: Improvement of the Bacterial Viability under Simulated Gastrointestinal Conditions Using Flaxseed Mucilage. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 1901–1908. [\[CrossRef\]](#)

134. Wang, L.Y.; Ma, G.H.; Su, Z.G. Preparation of Uniform Sized Chitosan Microspheres by Membrane Emulsification Technique and Application as a Carrier of Protein Drug. *J. Control. Release* **2005**, *106*, 62–75. [\[CrossRef\]](#)
135. Seo, J.Y.; Lee, B.; Kang, T.W.; Noh, J.H.; Kim, M.J.; Ji, Y.B.; Ju, H.J.; Min, B.H.; Kim, M.S. Electrostatically Interactive Injectable Hydrogels for Drug Delivery. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15*, 513–520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Gierszewska, M.; Ostrowska-Czubenko, J.; Chrzanowska, E. PH-Responsive Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complex Membranes Reinforced by Tripolyphosphate. *Eur. Polym. J.* **2018**, *101*, 282–290. [\[CrossRef\]](#)
137. Jardim, K.V.; Palomec-Garfias, A.F.; Andrade, B.Y.G.; Chaker, J.A.; Bão, S.N.; Márquez-Beltrán, C.; Moya, S.E.; Parize, A.L.; Sousa, M.H. Novel Magneto-Responsive Nanoplatfoms Based on MnFe₂O₄ Nanoparticles Layer-by-Layer Functionalized with Chitosan and Sodium Alginate for Magnetic Controlled Release of Curcumin. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *92*, 184–195. [\[CrossRef\]](#)
138. Katuwavila, N.P.; Perera, A.D.L.C.; Dahanayake, D.; Karunaratne, V.; Amaratunga, G.A.J.; Karunaratne, D.N. Alginate Nanoparticles Protect Ferrous from Oxidation: Potential Iron Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 404–409. [\[CrossRef\]](#)
139. Poncelet, D. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *944*, 74–82. [\[CrossRef\]](#)
140. Zhai, P.; Chen, X.B.; Schreyer, D.J. Preparation and Characterization of Alginate Microspheres for Sustained Protein Delivery within Tissue Scaffolds. *Biofabrication* **2013**, *5*, 015009. [\[CrossRef\]](#)
141. Ahmed, M.M.; El-Rasoul, S.A.; Auda, S.H.; Ibrahim, M.A. Emulsification/Internal Gelation as a Method for Preparation of Diclofenac Sodium-Sodium Alginate Microparticles. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 61–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
142. Perumal, D. Microencapsulation of Ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Int. J. Pharm.* **2001**, *218*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
143. Rodrigues, A.P.; Hirsch, D.; Figueiredo, H.C.P.; Logato, P.V.R.; Moraes, Â.M. Production and Characterisation of Alginate Microparticles Incorporating Aeromonas Hydrophila Designed for Fish Oral Vaccination. *Process. Biochem.* **2006**, *41*, 638–643. [\[CrossRef\]](#)
144. Shukla, S.; Jain, D.; Verma, K.; Verma, S. Formulation and in Vitro Characterization of Alginate Microspheres Loaded with Diloxanide Furoate for Colon-Specific Drug Delivery. *Asian J. Pharm.* **2010**, *4*, 199–204. [\[CrossRef\]](#)
145. Esposito, E.; Cortesi, R.; Luca, G.; Nastruzzi, C. Pectin-Based Microspheres: A Preformulatory Study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *944*, 160–179. [\[CrossRef\]](#)
146. Rahman, Z.; Kohli, K.; Khar, R.K.; Ali, M.; Charoo, N.A.; Shamsher, A.A.A. Characterization of 5-Fluorouracil Microspheres for Colonic Delivery. *AAPS PharmSciTech* **2006**, *7*, 113–121. [\[CrossRef\]](#)
147. Rastogi, R.; Sultana, Y.; Aqil, M.; Ali, A.; Kumar, S.; Chuttani, K.; Mishra, A.K. Alginate Microspheres of Isoniazid for Oral Sustained Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2007**, *334*, 71–77. [\[CrossRef\]](#)
148. Patil, S.B.; Sawant, K.K. Development, Optimization and in Vitro Evaluation of Alginate Mucoadhesive Microspheres of Carvedilol for Nasal Delivery. *J. Microencapsul.* **2009**, *26*, 432–443. [\[CrossRef\]](#)
149. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126. [\[CrossRef\]](#)
150. Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S.K. Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoidan for Bone Tissue Engineering. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 300–316. [\[CrossRef\]](#)
151. Schroeder, G. *Nanotechnologia, Kosmetyki, Chemia Supramolekularna*; Cursiva: Krakow, Poland, 2010.
152. Jantarathin, S.; Borompichaichartkul, C.; Sangundee, R. Microencapsulation of Probiotic and Prebiotic in Alginate-Chitosan Capsules and Its Effect on Viability under Heat Process in Shrimp Feeding. *Mater. Today Proc.* **2017**, *4*, 6166–6172. [\[CrossRef\]](#)
153. Arslan, S.; Erbas, M.; Tontul, I.; Topuz, A. Microencapsulation of Probiotic Saccharomyces Cerevisiae Var: Boulardii with Different Wall Materials by Spray Drying. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 685–690. [\[CrossRef\]](#)
154. Maleki, O.; Khaledabad, M.A.; Amiri, S.; Asl, A.K.; Makouie, S. Microencapsulation of Lactobacillus Rhamnosus ATCC 7469 in Whey Protein Isolate-Crystalline Nanocellulose-Inulin Composite Enhanced Gastrointestinal Survivability. *LWT-Food Sci. Technol.* **2020**, *126*, 109224. [\[CrossRef\]](#)
155. Calinoiu, L.F.; Ștefanescu, B.E.; Pop, I.D.; Muntean, L.; Vodnar, D.C. Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation. *Coatings* **2019**, *9*, 194. [\[CrossRef\]](#)
156. Trzaskowska, M. Probiotyki w Produktach Pochodzenia Roślinnego. *Zywn. Nauk. Technol. Jakosc* **2013**, *4*, 5–20.
157. Fuller, R. Probiotics in Man and Animals. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, *66*, 365–378.
158. Toczek, K.; Glibowski, P. Bakterie Probiotyczne w Żywności Nowe Kierunki Stosowania. *Przem. Spożywczy* **2015**, *69*, 42–45.
159. Sánchez-Portilla, Z.; Melgoza-Contreras, L.M.; Reynoso-Camacho, R.; Pérez-Carreón, J.I.; Gutiérrez-Nava, A. Incorporation of Bifidobacterium Sp. into Powder Products through a Fluidized Bed Process for Enteric Targeted Release. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 11129–11137. [\[CrossRef\]](#)
160. Muszyński, J.; Hudemowicz, P.; Gawlik, M. Mikroenkapsulacja—Innowacyjna Technologia Zwiększająca Biodostępność Probiotyków Dojelitowych. *Gaz. Farm.* **2019**, *3*, 1–3.
161. Kołodziej, M.; Łukasik, J.; Szajewska, H. Mikroenkapsulacja Probiotyków. *Pediatr. Pol.* **2017**, *92*, 594–601. [\[CrossRef\]](#)
162. Rokka, S.; Rantamäki, P. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
163. Narsaiah, K.; Jha, S.N.; Wilson, R.A.; Mandge, H.M.; Manikantan, M.R. Optimizing Microencapsulation of Nisin with Sodium Alginate and Guar Gum. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 4054–4059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Dajnowiec, F.; Biegaj, M.; Banaszczyk, P.; Kubiak, A.; Zander, L. Otrzymywanie Mikrokapsulek Alginianowych Za Pomocą Ultradźwięków. *Inżynieria Apar. Chem.* **2015**, *54*, 29–30.

165. Chen, K.N.; Chen, M.J.; Liu, J.E.R.; Lin, C.W.; Chiu, H.Y.I. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, M260–M266. [\[CrossRef\]](#)
166. Donthidi, A.R.; Tester, R.F.; Aidoo, K.E. Effect of Lecithin and Starch on Alginate-Encapsulated Probiotic Bacteria. *J. Microencapsul.* **2010**, *27*, 67–77. [\[CrossRef\]](#)
167. Trabelsi, I.; Bejar, W.; Ayadi, D.; Chouayekh, H.; Kammoun, R.; Bejar, S.; Ben Salah, R. Encapsulation in Alginate and Alginate Coated-Chitosan Improved the Survival of Newly Probiotic in Oxgall and Gastric Juice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *61*, 36–42. [\[CrossRef\]](#)
168. Sathyabama, S.; Kumar, M.R.; Devi, P.B.; Vijayabharathi, R.; Priyadharisini, V.B. Co-Encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Alginate Matrix and Its Effect on Viability in Simulated Gastric Environment. *LWT-Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 419–425. [\[CrossRef\]](#)
169. Bevilacqua, A.; Campaniello, D.; Speranza, B.; Racioppo, A.; Altieri, C.; Sinigaglia, M.; Corbo, M.R. Microencapsulation of Saccharomyces Cerevisiae into Alginate Beads: A Focus on Functional Properties of Released Cells. *Foods* **2020**, *9*, 1051. [\[CrossRef\]](#)
170. Ragavan, M.L.; Das, N. Process Optimization for Microencapsulation of Probiotic Yeasts. *Front. Biol.* **2018**, *13*, 197–207. [\[CrossRef\]](#)
171. Prevost, H.; Davies, C.; Rousseau, E. Continuous Yoghurt Production with Lactobacillus Bulgaricus and Streptococcus Thermophilus Entrapped in Ca-Alginate. *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 247–252. [\[CrossRef\]](#)
172. Prevost, H.; Davies, C. Fresh Fermented Cheese Production with Continuous Pre-Fermented Milk by a Mixed Culture of Mesophilic Lactic Streptococci Entrapped in Ca-Alginate. *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 789–794. [\[CrossRef\]](#)
173. Muthukumarasamy, P.; Holley, R.A. Survival of Escherichia Coli O157:H7 in Dry Fermented Sausages Containing Micro-Encapsulated Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 82–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Steenson, L.R.; Klaenhammer, T.R.; Swaisgood, H.E. Calcium Alginate-Immobilized Cultures of Lactic Streptococci Are Protected from Bacteriophages. *J. Dairy Sci.* **1987**, *70*, 1121–1127. [\[CrossRef\]](#)
175. Chandramouli, V.; Kailasapathy, K.; Peiris, P.; Jones, M. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect Lactobacillus Spp. in Simulated Gastric Conditions. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *56*, 27–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
176. Cheow, W.S.; Kiew, T.Y.; Hadinoto, K. Controlled Release of Lactobacillus Rhamnosus Biofilm Probiotics from Alginate-Locust Bean Gum Microcapsules. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103*, 587–595. [\[CrossRef\]](#)
177. Nualkaekul, S.; Lenton, D.; Cook, M.T.; Khutoryanskiy, V.V.; Charalampopoulos, D. Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum in Pomegranate Juice. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1281–1287. [\[CrossRef\]](#)
178. Chen, K.N.; Chen, M.J.; Lin, C.W. Optimal Combination of the Encapsulating Materials for Probiotic Microcapsules and Its Experimental Verification (R1). *J. Food Eng.* **2006**, *76*, 313–320. [\[CrossRef\]](#)
179. Muthukumarasamy, P.; Holley, R.A. Microbiological and Sensory Quality of Dry Fermented Sausages Containing Alginate-Microencapsulated Lactobacillus Reuteri. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *111*, 164–169. [\[CrossRef\]](#)
180. Corbo, M.R.; Bevilacqua, A.; Speranza, B.; Di Maggio, B.; Gallo, M.; Sinigaglia, M. Use of Alginate Beads as Carriers for Lactic Acid Bacteria in a Structured System and Preliminary Validation in a Meat Product. *Meat Sci.* **2016**, *111*, 198–203. [\[CrossRef\]](#)
181. Mirzaei, H.; Pourjafar, H.; Homayouni, A. Effect of Calcium Alginate and Resistant Starch Microencapsulation on the Survival Rate of Lactobacillus Acidophilus La5 and Sensory Properties in Iranian White Brined Cheese. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1966–1970. [\[CrossRef\]](#)
182. Chen, M.J.; Chen, K.N.; Kuo, Y.T. Optimal Thermotolerance of Bifidobacterium Bifidum in Gellan-Alginate Microparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 411–419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Muthukumarasamy, P.; Wojtas, P.; A Holley, R. Stability of Lactobacillus Reuteri in Different Types of Microcapsules. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 20–24. [\[CrossRef\]](#)
184. Özer, B.; Kirmaci, H.A.; Şenel, E.; Atamer, M.; Hayaloğlu, A. Improving the Viability of Bifidobacterium Bifidum BB-12 and Lactobacillus Acidophilus LA-5 in White-Brined Cheese by Microencapsulation. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 22–29. [\[CrossRef\]](#)
185. Amine, K.M.; Champagne, C.P.; Raymond, Y.; St-Gelais, D.; Britten, M.; Fustier, P.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Survival of Microencapsulated Bifidobacterium Longum in Cheddar Cheese during Production and Storage. *Food Control* **2014**, *37*, 193–199. [\[CrossRef\]](#)
186. Yeung, T.W.; Arroyo-Maya, I.J.; McClements, D.J.; Sela, D.A. Microencapsulation of Probiotics in Hydrogel Particles: Enhancing Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris LM0230 Viability Using Calcium Alginate Beads. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1797–1804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
187. Trabelsi, I.; Ayadi, D.; Bejar, W.; Bejar, S.; Chouayekh, H.; Ben Salah, R. Effects of Lactobacillus Plantarum Immobilization in Alginate Coated with Chitosan and Gelatin on Antibacterial Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 84–89. [\[CrossRef\]](#)
188. De Araújo Etchepare, M.; Nunes, G.L.; Nicoloso, B.R.; Barin, J.S.; Moraes Flores, E.M.; de Oliveira Mello, R.; Ragagnin de Menezes, C. Improvement of the Viability of Encapsulated Probiotics Using Whey Proteins. *LWT-Food Sci. Technol.* **2020**, *117*, 108601. [\[CrossRef\]](#)
189. Rajam, R.; Karthik, P.; Parthasarathi, S.; Joseph, G.S.; Anandharamakrishnan, C. Effect of Whey Protein-Alginate Wall Systems on Survival of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum in Simulated Gastrointestinal Conditions. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 891–898. [\[CrossRef\]](#)
190. Ningtyas, D.W.; Bhandari, B.; Bansal, N.; Prakash, S. The Viability of Probiotic Lactobacillus Rhamnosus (Non-Encapsulated and Encapsulated) in Functional Reduced-Fat Cream Cheese and Its Textural Properties during Storage. *Food Control* **2019**, *100*, 8–16. [\[CrossRef\]](#)
191. Mokarram, R.R.; Mortazavi, S.A.; Najafi, M.B.H.; Shahidi, F. The Influence of Multi Stage Alginate Coating on Survivability of Potential Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal Juice. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1040–1045. [\[CrossRef\]](#)

192. Ding, W.K.; Shah, N.P. Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, M100–M107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
193. Sheu, T.Y.; Marshall, R.T.; Heymann, H. Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 1902–1907. [\[CrossRef\]](#)
194. Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S.; Razavi, S.H. Effect of Microencapsulation and Resistant Starch on the Probiotic Survival and Sensory Properties of Synbiotic Ice Cream. *Food Chem.* **2008**, *111*, 50–55. [\[CrossRef\]](#)
195. Kailasapathy, K.; Masondole, L. Survival of Free and Microencapsulated Lactobacillus Acidophilus and Bifidobacterium Lactis and Their Effect on Texture of Feta Cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **2005**, *60*, 252–258.
196. Larisch, B.C.; Poncelet, D.; Champagne, C.P.; Neufeld, R.J. Microencapsulation of Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris. *J. Microencapsul.* **1994**, *11*, 189–195. [\[CrossRef\]](#)
197. Sabikhi, L.; Babu, R.; Thompson, D.K.; Kapila, S. Resistance of Microencapsulated Lactobacillus Acidophilus LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. *Food Bioprocess. Technol.* **2010**, *3*, 586–593. [\[CrossRef\]](#)
198. Holkem, A.T.; Raddatz, G.C.; Barin, J.S.; Moraes Flores, É.M.; Muller, E.I.; Codevilla, C.F.; Jacob-Lopes, E.; Ferreira Grosso, C.R.; de Menezes, C.R. Production of Microcapsules Containing Bifidobacterium BB-12 by Emulsification/Internal Gelation. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *76*, 216–221. [\[CrossRef\]](#)
199. Singh, J.; Kaur, K.; Kumar, P. Optimizing Microencapsulation of α -Tocopherol with Pectin and Sodium Alginate. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 3625–3631. [\[CrossRef\]](#)
200. Santagapita, P.R.; Mazzobre, M.F.; Buera, M.P. Formulation and Drying of Alginate Beads for Controlled Release and Stabilization of Invertase. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3147–3155. [\[CrossRef\]](#)
201. Gbassi, G.K.; Vandamme, T.; Ernahar, S.; Marchioni, E. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an Alginate Matrix Coated with Whey Proteins. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *129*, 103–105. [\[CrossRef\]](#)
202. Haghshenas, B.; Abdullah, N.; Nami, Y.; Radiah, D.; Rosli, R.; Khosroushahi, A.Y. Microencapsulation of Probiotic Bacteria Lactobacillus Plantarum 15HN Using Alginate-Psyllium-Fenugreek Polymeric Blends. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 1048–1057. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
203. Fareez, I.M.; Lim, S.M.; Mishra, R.K.; Ramasamy, K. Chitosan Coated Alginate-Xanthan Gum Bead Enhanced PH and Thermotolerance of Lactobacillus Plantarum LAB12. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1419–1428. [\[CrossRef\]](#)
204. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. The Influence of Coating Materials on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 737–743. [\[CrossRef\]](#)
205. Lee, K.; Heo, T.-R. Survival of Bifidobacterium Longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 869–873. [\[CrossRef\]](#)
206. Graff, S.; Chaumeil, J.C.; Boy, P.; Lai-Kuen, R.; Charrueau, C. Formulations for Protecting the Probiotic Saccharomyces Boulardii from Degradation in Acidic Condition. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 266–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
207. Martoni, C.; Bhatena, J.; Urbanska, A.M.; Prakash, S. Microencapsulated Bile Salt Hydrolase Producing Lactobacillus Reuteri for Oral Targeted Delivery in the Gastrointestinal Tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 225–233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
208. Liao, N.; Luo, B.; Gao, J.; Li, X.; Zhao, Z.; Zhang, Y.; Ni, Y.; Tian, F. Oligosaccharides as Co-Encapsulating Agents: Effect on Oral Lactobacillus Fermentum Survival in a Simulated Gastrointestinal Tract. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 263–272. [\[CrossRef\]](#)
209. Riaz, T.; Iqbal, M.W.; Saeed, M.; Yasmin, I.; Hassanin, H.A.M.; Mahmood, S.; Rehman, A. In Vitro Survival of Bifidobacterium Bifidum Microencapsulated in Zein-Coated Alginate Hydrogel Microbeads. *J. Microencapsul.* **2019**, *36*, 192–203. [\[CrossRef\]](#)
210. Zanjani, M.A.K.; Tarzi, B.G.; Sharifan, A.; Mohammadi, N. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-Gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-Intestinal Condition. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2014**, *13*, 843–852.
211. Annan, N.T.; Borza, A.D.; Hansen, L.T. Encapsulation in Alginate-Coated Gelatin Microspheres Improves Survival of the Probiotic Bifidobacterium Adolescentis 15703T during Exposure to Simulated Gastro-Intestinal Conditions. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 184–193. [\[CrossRef\]](#)
212. Sikora, E.; Miastkowska, M.; Lasoń, E. *Selected Skin Delivery Systems*; Wydawnictwo PK: Kraków, Poland, 2020.
213. Patravale, V.B.; Mandawgade, S.D. Novel Cosmetic Delivery Systems: An Application Update. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2008**, *30*, 19–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
214. Levi, S.; Rac, V.; Manojlovi, V.; Raki, V.; Bugarski, B.; Flock, T.; Krzyczmonik, K.E.; Nedovi, V. Limonene Encapsulation in Alginate/Poly (Vinyl Alcohol). *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1816–1820. [\[CrossRef\]](#)
215. Martins, E.; Poncelet, D.; Rodrigues, R.C.; Martins, E.; Poncelet, D.; Rodrigues, R.C.; Renard, D. Oil Encapsulation Techniques Using Alginate as Encapsulating Agent: Applications and Drawbacks. *J. Microencapsul.* **2017**, *38*, 754–771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
216. Lebeer, S.; Oerlemans, E.; Claes, I.; Henkens, T. Topical Cream with Live Lactobacilli Modulates the Skin Microbiome and Reduce Acne Symptoms. *bioRxiv* **2018**, 463307. [\[CrossRef\]](#)
217. Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P. Chitosan-Alginate Nanocapsules for Encapsulation of Turmeric Oil. *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci.* **2011**, *66*, 911–915. [\[CrossRef\]](#)
218. Shalaka, D.; Naik, S.R.; Amruta, A.; Parimal, K. Vitamin E Loaded Pectin Alginate Microspheres for Cosmetic Application. *J. Pharm. Res.* **2009**, *2*, 1098–1102.
219. Riseh, R.S.; Skorik, Y.A.; Thakur, V.K.; Pour, M.M.; Tamanadar, E.; Noghabi, S.S. Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11165. [\[CrossRef\]](#)

220. Riseh, R.S.; Ebrahimi-Zarandi, M.; Vazvani, M.G.; Skorik, Y.A. Reducing Drought Stress in Plants by Encapsulating Plant Growth-Promoting Bacteria with Polysaccharides. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12979. [\[CrossRef\]](#)
221. Fathi, F.; Saberi-Riseh, R.; Khodaygan, P. Survivability and Controlled Release of Alginate-Microencapsulated *Pseudomonas* Fluoresces VUPF506 and Their Effects on Biocontrol of *Rhizoctonia Solani* on Potato. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *183*, 627–634. [\[CrossRef\]](#)
222. Meng, L.; Ivanov, A.S.; Kim, S.; Zhao, X.; Kumar, N.; Young-gonzales, A.; Saito, T.; Bras, W.; Gluesenkamp, K.; Bocharova, V. Alginate—Sodium Sulfate Decahydrate Phase Change Composite with Extended Stability. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**, *4*, 6563–6571. [\[CrossRef\]](#)
223. Hia, I.L.; Lam, W.H.; Chai, S.P.; Chan, E.S.; Pasbakhsh, P. Surface Modified Alginate Multicore Microcapsules and Their Application in Self-Healing Epoxy Coatings for Metallic Protection. *Mater. Chem. Phys.* **2018**, *215*, 69–80. [\[CrossRef\]](#)
224. Tohoku, T.; Section, A.; Agency, E. Selective Separation and Recovery of Mo(VI) by Hybrid Microcapsules Containing Organic Extractants-10179. In Proceedings of the WM2010 Conference, Phoenix, AZ, USA, 7–11 March 2010; pp. 3–13.
225. Wang, L.; Li, H.; Yu, D.; Wang, Y.; Wang, W.; Wu, M. Hyperbranched Polyamide-Functionalized Sodium Alginate Microsphere as a Novel Adsorbent for the Removal of Antimony(III) in Wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 27372–27384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
226. Wu, Y.; Mimura, H.; Niibori, Y. Selective Uptake of Plutonium (IV) on Calcium Alginate Gel Polymer and TBP Microcapsule. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2009**, *281*, 513–520. [\[CrossRef\]](#)
227. Mimura, H.; Ohta, H.; Akiba, K.; Wakui, Y.; Onodera, Y. Uptake and Recovery of Platinum Group Metals Ions By Alginate Microcapsules Immobilizing Cyanex 302 Emulsions. *J. Nucl. Sci. Technol.* **2002**, *39*, 1008–1012. [\[CrossRef\]](#)
228. Zhao, F.; Qin, X.; Feng, S. Preparation of Microgel/Sodium Alginate Composite Granular Hydrogels and Their Cu²⁺ Adsorption Properties. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 100511–100518. [\[CrossRef\]](#)
229. Hao, D.; Huang, Q.; Wei, W.; Bai, X.; Ni, B.J. A Reusable, Separation-Free and Biodegradable Calcium Alginate/g-C₃N₄ Microsphere for Sustainable Photocatalytic Wastewater Treatment. *J. Clean. Prod.* **2021**, *314*, 128033. [\[CrossRef\]](#)
230. Goh, C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. Alginates as a Useful Natural Polymer for Microencapsulation and Therapeutic Applications. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
231. Pourjafar, H.; Noori, N.; Gandomi, H.; Akhondzadeh, A. Viability of Microencapsulated and Non-Microencapsulated Lactobacilli in a Commercial Beverage. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *25*, e00432. [\[CrossRef\]](#)
232. Haghshenas, B.; Nami, Y.; Haghshenas, M. Effect of Addition of Inulin and Fenugreek on the Survival of Microencapsulated *Enterococcus Durans* 39C in Alginate-Psyllium Polymeric Blends in Simulated Digestive System and Yogurt. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 350–361. [\[CrossRef\]](#)
233. Cavalheiro, C.P.; Ruiz-capillas, C.; Herrero, A.M.; Jiménez-colmenero, F.; Pintado, T.; Ragagnin, C.; Menezes, D.; Lucy, L.; Fries, M. Effect of Different Strategies of Lactobacillus Plantarum Incorporation in Chorizo Sausages. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 6706–6712. [\[CrossRef\]](#)
234. Karabulut, I.; Candogan, K. Effects of Encapsulated Starter Cultures on Microbial and Physicochemical Properties of Traditionally Produced and Heat Treated Sausages (Sucuks). *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *75*, 425–433. [\[CrossRef\]](#)
235. Angiolillo, L.; Conte, A.; Nobile, M.A. Del. Microencapsulated Lactobacillus Reuteri Combined with Modified Atmosphere as a Way to Improve Tuna Burger Shelf Life. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1576–1584. [\[CrossRef\]](#)
236. Kavas, N.; Kavas, G.; Kinik, Ö.; Ates, M.; Kaplan, M.; Şatir, G. Symbiotic Microencapsulation to Enhance Bifidobacterium Longum and Lactobacillus Paracasei Survival in Goat Cheese. *Food Sci. Technol.* **2022**, *42*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
237. Gandomi, H.; Abbaszadeh, S.; Misaghi, A.; Bokaie, S.; Noori, N. Effect of Chitosan-Alginate Encapsulation with Inulin on Survival of Lactobacillus Rhamnosus GG during Apple Juice Storage and under Simulated Gastrointestinal Conditions. *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *69*, 365–371. [\[CrossRef\]](#)
238. Zanjani, K.A.M.; Reza, M.E.; Tarzi, B.G.; Sharifan, A. Promoting Lactobacillus Casei and Bifidobacterium Adolescentis Survival by Microencapsulation with Different Starches and Chitosan and Poly L-Lysine Coatings in Ice Cream. *J. Process. Preserv.* **2017**, *42*, e13318. [\[CrossRef\]](#)
239. Barajas-álvarez, P.; González-ávila, M.; Espinosa-andrews, H.; Barajas-álvarez, P. Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal Conditions and Their Impact on Functional Food Formulation Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal. *Food Rev. Int.* **2021**, 1–22. [\[CrossRef\]](#)
240. Polina, C.C.; Zampogna, D.F.; Paliga, M.; Wisniewski, M.S.W.; Junges, A.; Steffens, J.; Cansian, R.L.; Backes, G.T. Encapsulation Methods for Probiotic Immobilization with Food Application Métodos de Encapsulação Para Imobilização de Probióticos Com Aplicação Em Alimentos. *Brazilian J. Dev.* **2021**, *7*, 22908–22929. [\[CrossRef\]](#)
241. Salem, I.; Ramser, A.; Isham, N.; Ghannoum, M.A. The Gut Microbiome as a Major Regulator of the Gut-Skin Axis. *Front. Biol.* **2018**, *9*, 1459. [\[CrossRef\]](#)
242. Prescott, S.L.; Larcombe, D.; Logan, A.C.; West, C.; Burks, W.; Caraballo, L.; Levin, M.; Van Etten, E.; Horwitz, P.; Kozyrskyj, A.; et al. The Skin Microbiome: Impact of Modern Environments on Skin Ecology, Barrier Integrity, and Systemic Immune Programming. *World Allergy Organ. J.* **2017**, *10*, 29. [\[CrossRef\]](#)
243. Burgain, J.; Gaiani, C.; Linder, M.; Scher, J. Encapsulation of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale to Industrial Applications. *J. Food Eng.* **2011**, *104*, 467–483. [\[CrossRef\]](#)

-
244. Aguirre Calvo, T.; Santagapita, P. Physicochemical Characterization of Alginate Beads Containing Sugars and Biopolymers. *J. Qual. Reliab. Eng.* **2016**, *2016*, 9184039. [[CrossRef](#)]
245. Lopes, M.; Abraham, B.; Veiga, F.; Seica, R.; Cabral, L.M.; Arnaud, P.; Andrade, J.C.; Ribeiro, A.J. Preparation Methods and Applications behind Alginate-Based Particles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2017**, *14*, 769–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Hu, Y.; Azadi, G.; Ardekani, A.M. Microfluidic Fabrication of Shape-Tunable Alginate Microgels: Effect of Size and Impact Velocity. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *120*, 38–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Hu, Y.; Wang, Q.; Wang, J.; Zhu, J.; Wang, H.; Yang, Y. Shape Controllable Microgel Particles Prepared by Microfluidic Combining External Ionic Crosslinking. *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 026502–265029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier

Anna Łętocha^{1*}, Alicja Michalczyk², Małgorzata Miastkowska¹, Elżbieta Sikora¹

¹ Cracow University of Technology, Department of Chemical Engineering and Technology, Warszawska 24, 31-155 Cracow, Poland

² Lukaszewicz Research Network – Institute of Industrial Organic Chemistry, Warsaw, Poland

* Corresponding author:

e-mail:
anna.letocha@doktorant.pk.edu.pl

Presented at 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering, 13–16 June 2023, Szczecin, Poland.

Article info:

Received: 27 April 2023

Revised: 23 June 2023

Accepted: 14 July 2023

Abstract

The process of obtaining alginate microspheres (AMs) by emulsification method was optimized by applying statistical analysis software. Ten batches of microspheres were prepared using the fractional plan 3^{K-P} . AMs were obtained with two different methods: an ultrasonic homogenization (UH) process and a rotor-stator mechanical homogenization (MH). The amount of a cross-linking agent (CaCl_2), calcium chloride rate addition, and the sonication amplitude (UH) or the speed of rotor rotation (MH) were selected as formulation variables. All the batches were evaluated in terms of stability and size of the alginate microspheres. Approximation profiles were developed. As a result of the conducted research, stable alginate microspheres with sizes ranging from 10 to 30 micrometres were obtained. The obtained results showed that the quality of AMs was mainly affected by the concentration and the rate of calcium chloride addition into the system. Therefore, the role of calcium ions in the mechanisms of shell structuring was discussed. *Lactobacillus casei* bacteria were encapsulated into the batches found to be optimum. The high encapsulation efficiency (EE) of the bacteria (72–94%) depending on the form) and their viability over time were obtained. The model developed in the study can be effectively utilized to achieve the AMs formulations.

Keywords

alginate microspheres, optimization, *Lactobacillus casei*, encapsulation, emulsification

1. INTRODUCTION

Alginates are natural polysaccharides obtained from marine algae (Gomathi et al., 2017; Trnnesen and Karlsen, 2002). The polymers are unbranched copolymers of D-mannuronic acid (M) and L-guluronic acid (G) linked by β (1-4) glycosidic bonds (Asgari et al., 2020; Kim et al., 2019; Paques, 2014; Van Vlierberghe et al., 2014; Walczak et al., 2015; Wyrębska et al., 2014). The individual monomers in the chain are arranged in an irregular block pattern with different GG, MM and MG block proportions (Iravani et al., 2015; Paques, 2014; Trnnesen and Karlsen, 2002; Van Vlierberghe et al., 2014; Wyrębska et al., 2014).

The monovalent metal ions with the alginates form soluble salts, while the divalent and multivalent cations form gels or deposits. Alginates containing a large number of guluronic acid blocks form gels with much greater strength compared to alginates rich in manuronates, because G blocks have a stronger affinity for divalent ions than M blocks (Trnnesen and Karlsen, 2002). Biodegradable microspheres are obtained by cross-linking the alginate structure with divalent cations, in particular Ca^{2+} . The alginate microparticles (AMs) are biocompatible, biodegradable and nontoxic delivery systems used to encapsulate natural active substances, including probiotics (Choukaife et al., 2020; Iravani et al., 2015; Puscaselu et al., 2020).

Most of the scientific articles focus on application of alginate microparticles in the food and pharmaceutical industries (Dhamecha et al., 2019; Martău et al., 2019; Puscaselu et al., 2020; Yang et al., 2020). Recently, environmental application of alginate carriers as microspheres and microcapsules is more frequent (Wang et al., 2019). However, the AMs application in cosmetic industry has not been very popular. There are only a few reports regarding the use of alginate capsules as carriers of turmeric oil or vitamin E (Lebeer et al., 2018; Lin et al., 2016; Shalaka et al., 2009).

In the case of cosmetic products an application of different vehicles helps to combine various active substances in one formula, solves problems related to the incompatibility of the substances (Sikora et al., 2020) and protect the actives against oxidation (Martins et al., 2017). Additionally, microparticles are used to enclose unpleasant-smelling substances and, as a result, to obtain products with a low odour or completely without it (Łętocha et al., 2022). When probiotics are used in cosmetic formulations, the microencapsulation process allows survival of the microorganisms despite the presence of preservatives. Compared to other effective carriers of active compounds, such as nanoparticles, the advantage of microcarriers is that they do not penetrate into the interstitial tissue and thus act locally (Lengyel et al., 2019; Łętocha et al., 2022; Wang et al., 2019). The choice of microparticles instead of nanoparticles for cosmetic prod-



© 2023. The Author(s). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC-BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

1 of 13

ucts may be an ideal solution for epidermal effect, where the encapsulated ingredient is to act on the top layer of the epidermis and thus positively affect the skin microbiome. In addition, nanocarriers are not suitable, due to their small size, for encapsulating active ingredients with sizes larger than nano, e.g. bacteria.

The most commonly used methods of encapsulating compounds in alginate capsules include techniques such as extrusion, emulsification and spray drying (Tyagi et al., 2011). Each method has its advantages and disadvantages. However, due to the different size of the particles obtained by these methods, emulsification was selected for testing, because this technique allows to obtain smaller capsules (μm) than other techniques (mm), which is the most desirable in the case of the cosmetics industry, where large particles negatively affect the texture of the cosmetic and the consumer feeling.

The purpose of this study was to obtain the high-quality polymer microspheres by emulsification process, especially in the potential use of the alginate microparticles in the cosmetics industry. The effect of the emulsification parameters on the size of the bacteria-loaded alginate microspheres was evaluated. In order to optimize the process parameters, for subsequent encapsulation in optimal forms of probiotic bacteria, a statistical method of experimental design (DOE) was applied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Alginic acid sodium salt from brown algae, sodium citrate, MRS broth and MRS agar (de Man Rogosa Sharpe) were purchased from Sigma Aldrich (Poland). Calcium chloride was bought in Avantor Performance Materials Poland S.A. The capric-caprylic triglycerides and ECO-Tween 80 were kindly supplied by Croda (Poland). *Lactobacillus casei* strain ATCC 393 was purchased from American Type Culture Collection, (USA).

2.2. Method for obtaining blank microdispersions

Microdispersions with alginate microspheres were prepared using a modified encapsulation method described by Sheu and Marshall (1993) and Sultana et al. (2000). All details of the methodology are described and claimed in patent application P. 443812 (Łętocha et al., 2023). Briefly, the water in oil (W/O) pre-emulsion was prepared by mixing the encapsulating material (2% sodium alginate solution) with capric-caprylic triglycerides and 1% ECO-Tween 80. To reduce the water phase particle size, the emulsion was mixed thoroughly using a homogenizer (Unidrive X 1000, CAT) or sonicator (UP200 Ht, Hielscher). Next, the obtained system was stirred with a magnetic stirrer (IKA C-MAG HS 7) and water solution of 0.1–0.5 M calcium chloride was slowly added dropwise to form a dispersion containing microspheres. After the addition of CaCl_2 solution, the stirring of alginate microsphere dispersion was continued for an additional period of time (5–30 minutes). The microdispersions were then stored in the refrigerator and their stability was observed over time. After a defined period of time (24 h, 10 days) the stability of the dispersions was macroscopically observed. Figure 1 shows the scheme of the production of alginate microspheres.

2.3. Optimization process

The process of obtaining alginate microspheres were optimized with the use of mathematical methods of experiment planning (Statistica® ver. 13, StatSoft, Poland). The aim of the optimization was to determine the process parameters allowing to obtain stable microcapsules of relatively small size ($d < 100 \mu\text{m}$). In order to develop the best parameters of AMs production the statistical method of experimental design (DOE) with the fractional plan 3^{K-p} was used. Where K is the number of variables and p always takes the value 1. First, the process structure and the variables influencing the final alginate microcapsules properties were determined (Figure 2).

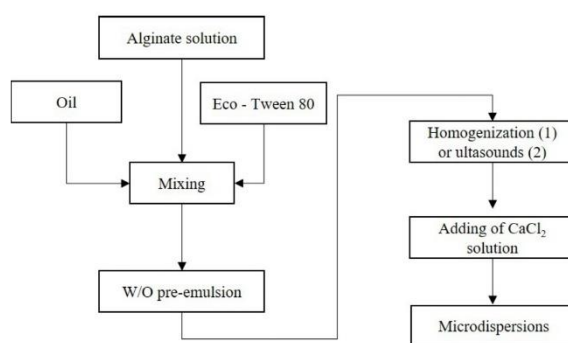


Figure 1. Block diagram of the microdispersion formulation process.

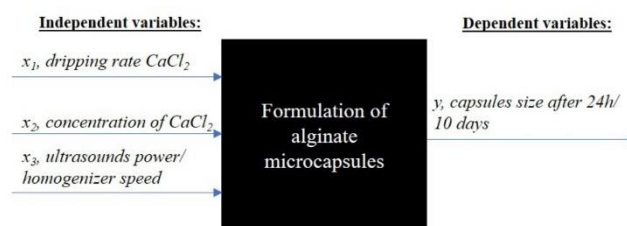


Figure 2. Schematic description of the optimization process.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed based on one-way analysis of variance (ANOVA). The significance of differences was assessed using the F test. In all cases, a p value <0.05 was considered statistically significant. Approximation profiles have been developed taking into account independent parameters (dripping rate and concentration of calcium chloride, and homogenization method). By means of these profiles, it was possible to determine changes in dependent parameters (microcapsules size after 24 h and 10 days) depending on changes in the value of independent parameters. Approximation profiles were obtained, that allowed to determine which values of the input variables provide the most useful values of the output variables. The approximate values were then converted to a utility scale ranging from 0 to 1. The least desirable effect is 0 (the largest microcapsule size) and 1 (the smallest microcapsule size) is the most desirable effect. On the basis of the obtained approximation profiles, it was possible to optimize the usability of the composition.

2.5. Determination of microdispersion droplet size

Optical microscope measurements were performed to determine the droplet size of the microdispersion. A small amount of the dispersion to be tested was placed on a glass slide and covered with a coverslip. The observations were made using the Motic B1 Advanced Series Microscope equipped with a digital camera. The droplet diameter for each sample was determined from the mean of 200 measurements $\pm$ SD.

2.6. pH measurements

The pH of W/O microdispersions were measured using a Mettler Toledo S47 SevenMulti pH meter. First, the electrode was washed with a large amount of distilled water, and then it was placed in the test sample and the measurement was made. For each sample, the result was given as the mean of three measurements $\pm$ SD.

2.7. SEM analysis

The morphology of the obtained microspheres was observed with a scanning electron microscope (Mira3-FEG-SEM, TESCAN, Brno—Kohoutovice, Czech Republic) with a pole emis-

sion (Schottky emitter), equipped with an X-ray energy dispersive spectrometer EDX (Oxford Instruments) and a cooling table (Peltier), operating in a temperature range from as low as -30°C . The samples, for SEM investigations, were prepared by rapid freezing in liquid nitrogen followed by freeze-drying for 24 h (Al-Abboodi et al., 2019; Mao et al., 2019; Miastkowska et al., 2020).

2.8. TEM Analysis

The morphology of the microdispersions was investigated using a transmission electron microscope JEOL JEM 2100 HT (Jeol Ltd., Tokyo, Japan). Samples were collected on 300 mesh grids made from copper, additionally covered with formvar film. On each grid was applied 5 μL of samples. The excess was removed using the filter paper and was left to dry at ambient temperature. The transmission electron microscope was used for observation with accelerating voltage of 80 kV. Images were taken using a 4 k $\times$ 4 k camera (TVIPS) equipped with EMMENU software ver. 4.0.9.87 (TVIPS GmbH, Gauting, Germany) (Ryś et al., 2022).

2.9. Bacterial strain and culture condition

Pure freeze dried culture of *Lactobacillus casei* strain ATCC 393 (LAB) was inoculated into MRS broth and incubated at 30°C for 48 h in aerobic conditions. Harvesting of cells in the logarithmic phase was carried out by centrifugation at $3000\times g$ for 10 min at 4°C . The cells were washed twice using sterile saline solution (0.9%) (w/v). The cell pellets were resuspended in normal saline and prepared at a final concentration of $10.6 \log \text{CFU/g}$. The numbers of bacteria in the cell suspension was determined by counting on plates in MRS agar medium (37°C , 72 h), using the pour plate inoculation technique (Arenales-Sierra et al., 2019). The obtained bacterial suspensions were used in the microencapsulation process.

2.10. Encapsulation of probiotics

The encapsulation of probiotics (*Lactobacillus casei* bacteria) was done in the similar way as the preparation of the blank microdispersions. The only difference was the composition of the water phase. In this case, the aqueous phase consisted of the aqueous solution of sodium alginate (2%)

and bacteria suspension. The mass ratio of the sodium alginate solution to the bacterial cell suspension was 4:1. In order to separate microspheres, the samples were centrifuged in a laboratory centrifuge (EBA 20 by Hettich Zentrifugen). Samples of the microspheres without centrifugation (1), microspheres spun at 500 rpm (2) and 30000 rpm (3) and stable microdispersion (4), were selected for further tests.

2.11. Assessment of microencapsulation efficiency and survival of probiotic bacteria during storage

The obtained microspheres (1, 2, 3) and microdispersion (4) were stored at room temperature for 1 month. The assessment of the viability of microdispersion and microcapsules with LAB was carried out immediately after encapsulation, and after 7 and 30 days after the process in line with the methodology described by Guimarães et al. (2013). Suspension of the bacteria cells not subjected to encapsulation was used as the control.

A one-gram portion of microcapsules was dissolved in 9 mL of 0.2 mol L⁻¹ sterile sodium citrate solution (pH 6.0) and then vortexed.

Serial dilutions were performed and then the obtained solutions were inoculated by the pour plate method (1 mL) on plates containing MRS-agar medium. Viable cells were enumerated as the number of colonies after incubation for 72 h, at 37 °C, in aerobic condition. Results were shown as log colony forming units per gram (log CFU g⁻¹). All tests were conducted in triplicates.

The microencapsulation efficiency (EE [%]) of *L. casei* was calculated using Eq. (1) and expressed as the percent of the log CFU g⁻¹ (Darjani et al., 2016).

$$EE = (N/N_o) \times 100\% \quad (1)$$

In this equation, N stand for the number of bacterial cells caught inside the microspheres or microdispersion, and N_o is the number of free *L. casei* cells added during encapsulation process (Darjani et al., 2016; Shafizadeh et al., 2020). The reduction in viability was characterized by the formula; $N_o - N$ and expressed in log CFU/g.

3. RESULTS

3.1. The influence of input parameters on the size of obtained microspheres

The process of obtaining alginate microparticles was optimized with the use of mathematical methods of experiment planning. Two fractional plans (ultrasound (UH) and high shear homogenization (MH)) were prepared, with one point at the centre of the plan. It was checked whether the input parameters (Table 1) significantly affect the output parameters.

The size of the capsules after 24 h and 10 days [μm] were classified as a group of output parameters for both plans. Tables 2 and 3 present the results of the optimization process

Table 1. The variability ranges of independent parameters.

Concentration of calcium chloride [mol/dm ³]	0.1; 0.3; 0.5	
Dropping rate of calcium chloride [drop/min]	5; 10; 15	
Homogenisation method	UH [%]	69; 79; 89
	MH [rpm]	8 000; 10 000; 12 000

Table 2. Matrix of the experimental design and experimental data obtained for the dependent variables with the use of ultrasound method.

No of the system	Input parameters			Physicochemical properties of microdispersions from experimental design				
	C_{CaCl_2} [mol/l]	$V_{drop, CaCl_2}$ [drop/min]	Ultrasounds [%]	Capsule size after 24 h [μm] ±SD	Capsule size after 10 days [μm] ±SD	Stability after 24 h	Stability after 10 days	pH
1	0.1	5	69	10.76±4.25	10.77±5.65	+	+	6.05±0.02
2	0.1	10	89	14.16±8.47	15.31±8.69	+	–	6.05±0.02
3	0.1	15	79	28.87±14.62	30.78±17.17	+	–	6.05±0.02
4	0.3	5	89	16.91±6.99	17.23±7.69	+	–	5.90±0.02
5	0.3	10	79	15.65±8.01	16.14±10.64	–	–	5.90±0.02
6	0.3	15	69	23.88±13.65	32.56±22.66	–	–	5.90±0.02
7	0.5	5	79	10.74±4.39	13.71±11.79	–	–	5.84 ±0.01
8	0.5	10	69	16.31±9.95	29.75±18.41	–	–	5.84 ±0.01
9	0.5	15	89	30.30±15.89	30.30±18.95	–	–	5.84 ±0.01
10	0.3	10	79	15.65±8.01	16.14±10.64	–	–	5.90±0.02

Table 3. Matrix of the experimental design and experimental data obtained for the dependent variables with the use of high shear homogenisation method.

No of the system	Input parameters			Physicochemical properties of microdispersions from experimental design				
	C_{CaCl_2} [mol/l]	$V_{drop\ CaCl_2}$ [drop/min]	Homogenisation [rpm]	Capsule size after 24 h [μ m] $\pm$ SD	Capsule size after 10 days [μ m] $\pm$ SD	Stability after 24 h	Stability after 10 days	pH
1	0.1	5	8000	15.54 $\pm$ 8.85	15.55 $\pm$ 8.26	+	+	6.05 $\pm$ 0.02
2	0.1	10	12000	16.29 $\pm$ 7.99	16.58 $\pm$ 9.26	+	–	6.05 $\pm$ 0.02
3	0.1	15	10000	22.83 $\pm$ 13.84	23.11 $\pm$ 16.87	+	–	6.05 $\pm$ 0.02
4	0.3	5	12000	18.14 $\pm$ 6.62	18.45 $\pm$ 13.79	+	–	5.90 $\pm$ 0.02
5	0.3	10	10000	15.73 $\pm$ 8.32	18.61 $\pm$ 13.79	–	–	5.90 $\pm$ 0.02
6	0.3	15	8000	24.07 $\pm$ 24.98	30.39 $\pm$ 20.22	–	–	5.90 $\pm$ 0.02
7	0.5	5	10000	7.16 $\pm$ 3.45	18.21 $\pm$ 18.48	–	–	5.84 $\pm$ 0.01
8	0.5	10	8000	13.12 $\pm$ 10.26	19.34 $\pm$ 15.94	–	–	5.84 $\pm$ 0.01
9	0.5	15	12000	17.71 $\pm$ 12.71	27.77 $\pm$ 17.99	–	–	5.84 $\pm$ 0.01
10	0.3	10	10000	15.73 $\pm$ 8.32	18.61 $\pm$ 13.79	–	–	5.90 $\pm$ 0.02

obtained by ultrasound and rotor-stator mechanical homogenization methods, respectively.

On the basis of the obtained results it was found that the amount of a cross-linking agent ($CaCl_2$) and the calcium chloride rate addition are parameters influencing the microcapsules properties.

The most stable microdispersions with the smallest capsules size were obtained (independently of homogenization method used) for the samples at the concentration of calcium chloride solution amount 0.1 mol/dm³ and for the lowest rate of adding the cross-linking agent (5 drop/min). The remaining samples delaminated spontaneously, thanks to which it was easy to isolate the microspheres from the obtained microdispersion that deposited at the bottom of the test tubes. In order to accelerate the isolation of the microcapsules, the dispersions were centrifuged (500 rpm to 30 000 rpm) and stored in a refrigerator (at 5 °C) in the next steps.

3.2. Statistical analysis

The obtained results were analysed statistically. Figure 3 presents Pareto charts for the input parameters mentioned. Statistically significant parameters for a fixed p value ($p < 0.05$) are marked with a red line.

Based on the graphs, it is stated that the parameters that have a statistically significant influence on the particle size after 24 hours and 10 days in the case of ultrasound are the dripping rate of calcium chloride as a linear function. However, when using homogenization to the group of parameters that have a statistically significant impact on the particle size after 24 hours, there are the rate of cross-linking agent drops addition as a linear function and the concentration of

calcium chloride as a linear and quadratic function, which proves a strong influence of this parameter on the size of microparticles. On the other hand, after 10 days, the drop rate of calcium chloride, as a dimension of the square function, is an additional parameter significantly influencing the particle size. This proves the enhancement of the influence of those parameters on the size of the microspheres.

The full general regression equation is shown below. The Eq. (2) takes into account all independent parameters. The coefficients of the Eq. (2) are summarized in Table 4.

$$y = a + bx_1 + cx_1^2 + dx_2 + ex_2^2 + f x_{(3u/h)} b + g x_{(3u/h)}^2 \quad (2)$$

where: $x_1 = C_{CaCl_2}$, $x_2 = V_{CaCl_2}$, $x_{3u} = UH$, $x_{3h} = MH$.

The next point of statistical analysis includes approximation profiles. The approximation profiles are presented in Figures 4 and 5. On the basis of the approximation profiles, the influ-

Table 4. The coefficients of regression equations for ultrasonification and homogenization method.

Coefficients	Ultrasonification		Homogenisation	
	after 24 h	after 10 days	after 24 h	after 10 days
a	20.0565	206.0285	72.4396	55.2031
b	8.0534	9.3917	43.0485	43.5368
c	–8.4832	7.8273	–94.8997	–58.5507
d	–2.3632	–0.4108	–1.2897	–2.3227
e	0.1926	0.1071	0.104	0.1645
f	–0.220	–4.8537	–0.0116	0.0073
g	0.0025	0.0296	$5.8 \cdot 10^{-7}$	$3.5 \cdot 10^{-7}$

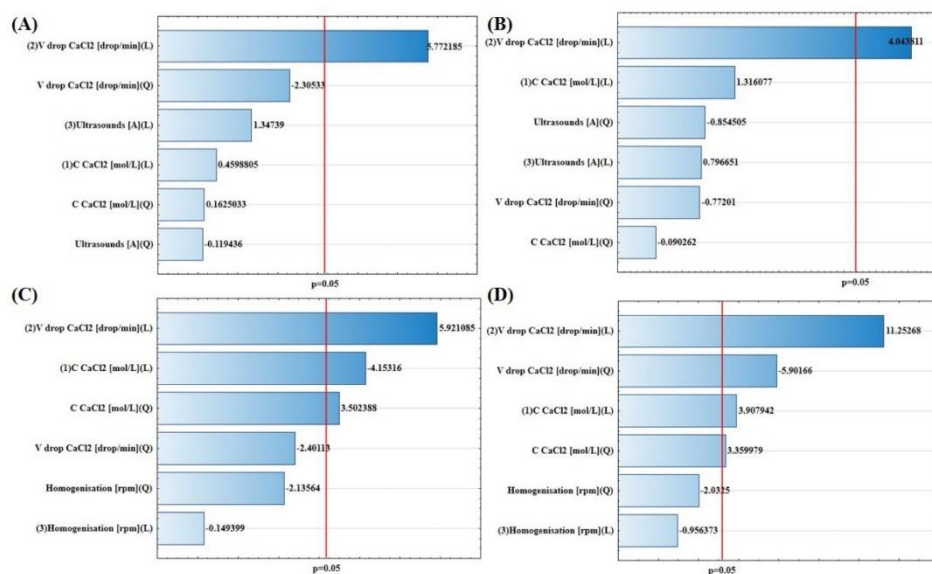


Figure 3. Pareto charts for prepared compositions: (A) capsule size after 24 h [μm] by ultrasonification, (B) capsule size after 10 days [μm] by ultrasonification, (C) capsule size after 24 h [μm] by homogenisation, (D) capsule size after 10 days [μm] by homogenisation.

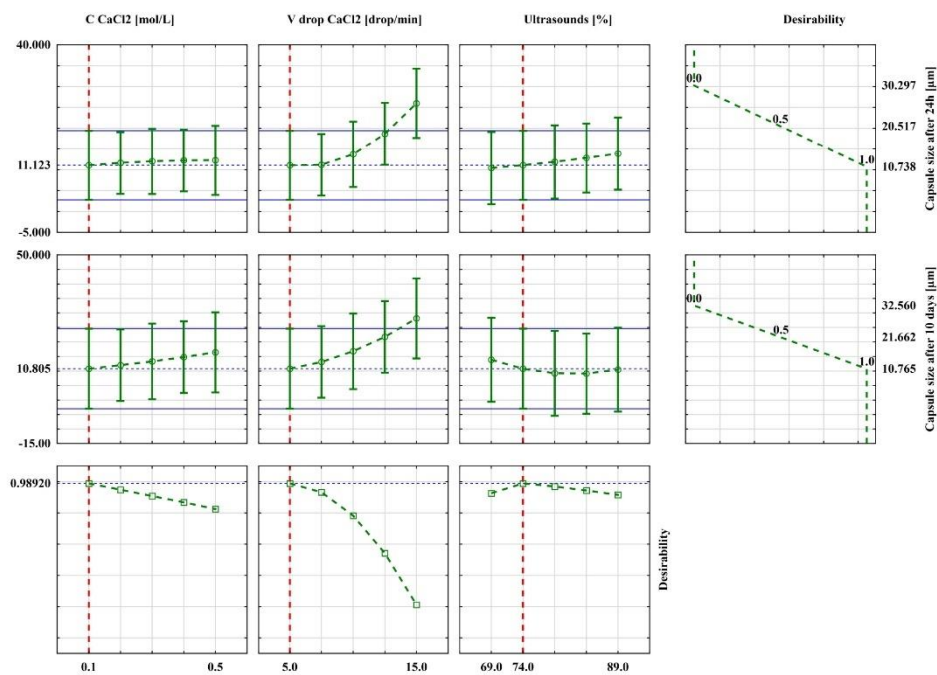


Figure 4. Approximation profiles for prepared compositions with ultrasonification method.

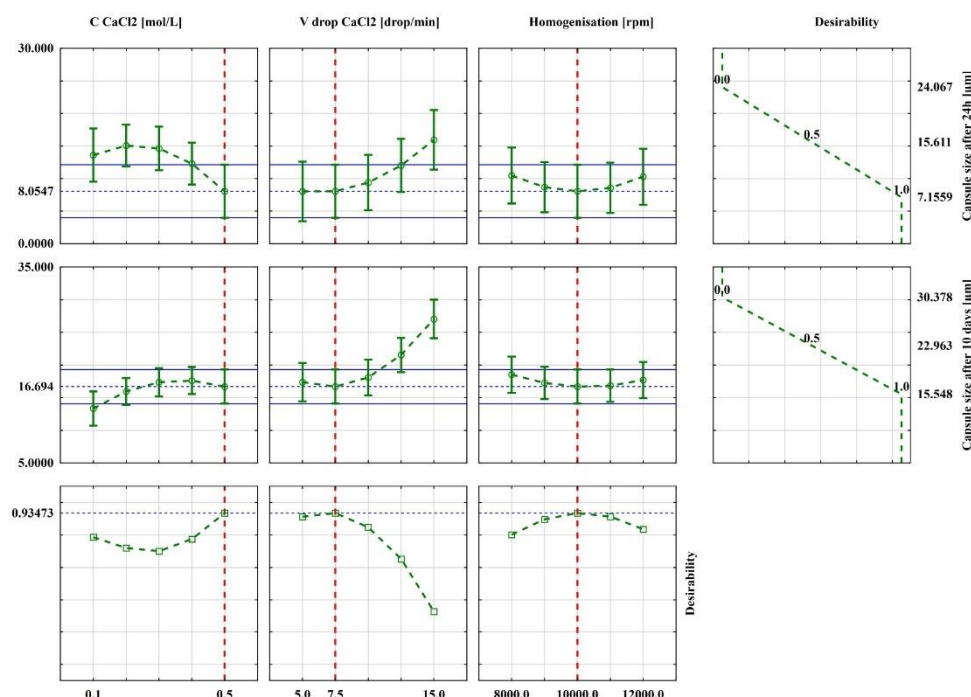


Figure 5. Approximation profiles for prepared compositions by homogenization.

ence of the input parameters on the output variables as well as the determination of specific values of the independent parameters ensure the possibility of achieving the desired values of the output variables. The most desirable values are the smallest particle size, both after 24 h and 10 days, because the smaller the size, the better the consistency of the cosmetic. However, on the other hand, the sizes cannot be nanometric, because if these carriers are to be used to encapsulate bacteria, the sizes must be micrometric.

The analysis of the approximation profiles for prepared compositions by ultrasonication method (Fig. 4) shows that microparticles with the smallest size of approx. 11 µm are obtained for the lowest concentration of calcium chloride used (0.1 M), the minimum rate of cross-linking addition at the level of 5 drop/min and amplitude values of 74%, after 10 days of storage. The charts show that the microsphere size are stable over time (similar dimensions after 24 h and 10 days). The graphs also show that the average microparticle size changes slightly with increasing concentration of cross-linking agent. In the case of rate of calcium chloride addition, the size of the microspheres increases as the rate of addition of the cross-linking agent increases. In turn, analysing the influence of the amplitude on the particle size, after 24 hours, an increase in their size is observed along with the increase in

amplitude. However, after 10 days, the particle size decreases to an amplitude of 74% and then begins to increase.

The analysis of the approximation profiles for prepared compositions with homogenization (Fig. 5) shows that microparticles with the smallest size of approx. 8 µm (24 h) and approx. 17 µm (10 days) are obtained for the highest concentration of calcium chloride used, crosslinking at the level of 7.5 drop/min and an intermediate homogenization value of 10 000 rpm. The graphs also show that the average size of microparticles increases with increasing concentration of cross-linking agent to the value of 0.4 mol/dm³, and then begins to decrease. When analysing the rate of dropping, an increase in particle size is observed after the value of 7.5 drop/min is exceeded. In the case of amplitude, the particle size decreases to an intermediate value and then begins to increase.

Figure 6 shows the surface response charts for the desirability in terms of dripping rate and concentration of calcium chloride, as a result of the ultrasonication method and the homogenization method (and this range was extended by model calculations).

The data presented in Figure 6 shows that in order to obtain microparticles with the smallest size with the use of ultra-

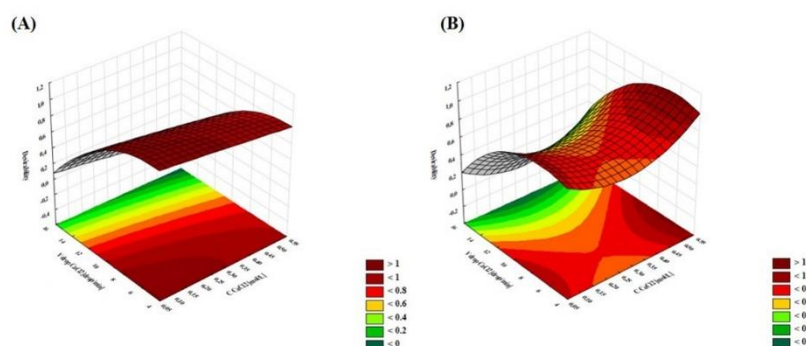


Figure 6. Response surface plots for the desirability with respect of dripping rate and concentration of CaCl_2 : (A) as a result of the ultrasonification method, (B) as a result of the homogenization method.

sound, dripping rate and concentration of CaCl_2 should be in the range from 4 to 8 drop/min and 0.05 to 0.3 mol/dm³, respectively. In the case of homogenization, dripping rate and concentration of cross-linking agent should be in the range from 4 to 10 drop/min and 0.5 to 0.55 mol/dm³, respectively.

Based on the design of experiments (DOE), the ultrasonification method was chosen for further research (due to the shorter preparation time of the samples) and stable microdispersion (denoted as number 4 in the further part), and microspheres samples (marked as number 1, 2 or 3) (Table 5). The efficiency of encapsulation was checked when using different

centrifugation speeds (no centrifugation (microspheres 1), 500 rpm (microspheres 2) and 30 000 rpm (microspheres 3).

Although the amplitude did not have a statistically significant effect on the preparation of microspheres, the use of the smallest amplitude (69%) was chosen due to the lower energy consumption and thus the cost of the process.

3.3. AMs Morphology analysis

Morphology and size of obtained microparticles were analysed by transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 7)

Table 5. Input and output parameters for optimal formulations.

	Concentration of calcium chloride [mol/dm ³]	Dropping rate of calcium chloride [drop/min]	Homogenisation method UH [%]	Capsule size after 24 h [μm]±SD	Capsule size after 10 days [μm]±SD
Microdispersion (ref. 4)	0.1	5	69	10.76±4.25	10.77±5.65
Mikrospheres (ref. 1/2/3)	0.3	10	69	15.87±7.03	16.78±9.13

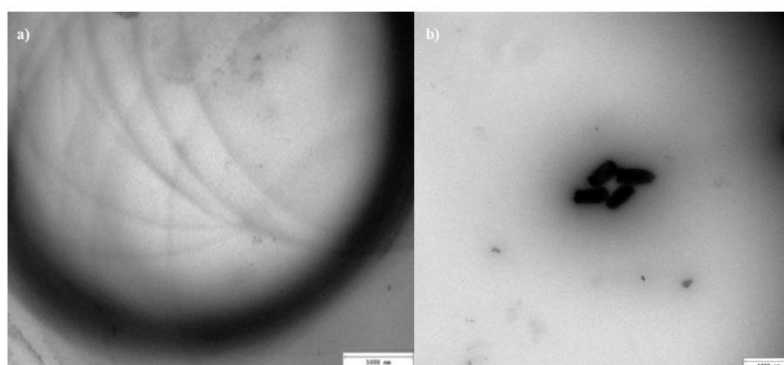


Figure 7. Transmission electron micrograph of a) structure of microdispersion, b) probiotic bacteria closed in microdispersion.

and scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 8). The TEM image of the microdispersion confirmed that droplets were spherical with the micro-size range.

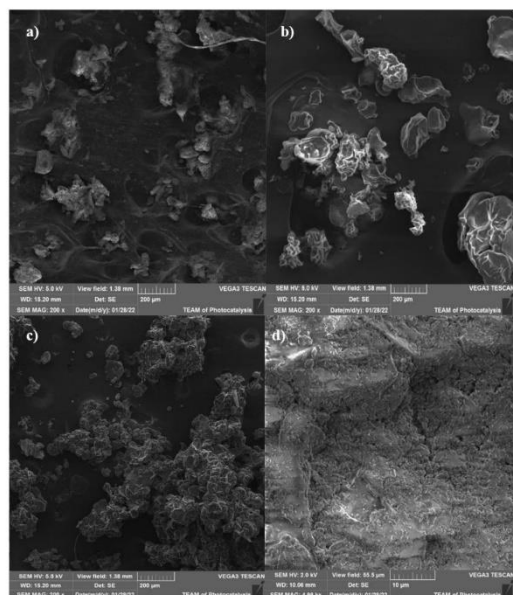


Figure 8. Scanning electron micrograph of a) structure of microsphere obtained without the centrifugation, b) structure of microsphere obtained with the 500 rpm, c) structure of microsphere obtained with the 30 000 rpm, d) cross- section through microsphere.

The scanning electron microscopy technique has been widely used to investigate a microparticle surface topography and its network structure. The SEM images (Fig. 8) of microspheres obtained by different centrifugation speed showed that the use of a centrifugation speed of 30 000 rpm caused the destruction of the microsphere structure as a result of strong centrifugal force. On the other hand, in the case of using

the speed of 500 rpm, microspheres of spherical shape were obtained. In addition, the micrographs show the surface of the obtained structures. As can be seen (Fig. 8), AMs microspheres have a porous structure, which is consistent with the studies of other research groups.

3.4. Viability of bacteria and encapsulation efficiency

Table 6 presents the results of viability assessment and encapsulation efficiency of *L. casei* species bacteria (LAB) enclosed in microspheres (1, 2, 3) and microdispersion (4). Microencapsulation efficiency was determined immediately after the process. The viability of probiotic cells was assessed after encapsulation, and after 7 and 30 days of storage at room temperature.

Suspension of LAB cells not subjected to encapsulation with the initial density of $10.6 \log \text{CFU g}^{-1}$ was used as the control (N_0). Decapsulation was carried out with 0.2 mol/L sodium citrate solution with $\text{pH} = 6$. The assessment of viability of free and encapsulated probiotic cells was carried out by counting of bacterial colonies grown on plates with MRS agar medium (incubation conditions: 37°C , 72 hours) using pour plate inoculation method. The results obtained were expressed in $\log \text{CFU g}^{-1}$.

The studies showed that microencapsulation efficiency (EE) of live bacterial cells (LAB) enclosed in microspheres and microdispersion depends on the method of their preparation and varies from 72% to 94%. The highest microencapsulation efficiency (EE) was obtained in microspheres 2 (microspheres centrifuged at 500 rpm) and microspheres 3 (microspheres centrifuged at 30 000 rpm), which amounted to 94% and 87%, respectively. Slightly lower EE values were obtained in microspheres 1 (microspheres without centrifugation) and microdispersion 4, which amounted to 84% and 72%, respectively.

The reduction in numbers of live bacterial cells in formulations 1, 2, 3, 4 amounted to: directly after encapsulation process; from 0.4–2.97 $\log \text{CFU g}^{-1}$. 7 days after encapsulation

Table 6. Assessment of viability of encapsulated probiotic cells (LAB) over time. Determination of the microencapsulation process efficiency (EE).

Sample no.	Immediately after encapsulation			7 days after encapsulation		30 days after encapsulation	
	Cell viability [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	Reduction [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	EE [%]	Cell viability [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	Reduction [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	Cell viability [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	Reduction [$\log \text{CFU g}^{-1}$]
1	8.9 ± 0.2	1.7	84 ± 1.8	8.52 ± 0.9	2.08	6.34 ± 0.9	4.26
2	10.0 ± 0.4	0.6	94 ± 0.5	9.13 ± 0.6	1.47	6.77 ± 0.5	3.83
3	9.22 ± 0.2	1.38	87 ± 1.2	8.8 ± 0.4	1.8	6.39 ± 1.2	4.21
4	7.63 ± 0.8	2.97	72 ± 0.4	7.5 ± 1.1	3.1	6.36 ± 0.5	4.24

1 – microspheres without centrifugation, 2 – microspheres centrifuged at 500 rpm,

3 – microspheres centrifuged at 30 000 rpm, 4 – microdispersion. All values are mean $\pm$ standard deviation of three

process; 1.47–3.1 log CFU g⁻¹, 30 days after encapsulation; 3.83–4.26 log CFU g⁻¹.

The highest survival rate of *L. casei* strain up to day 30 of the study was found in microspheres 2. For these microspheres, the decrease in the number of live LAB cells was from 0.6 log CFU g⁻¹ directly after encapsulation to 3.83 log CFU g⁻¹ after 30 days of storage. The lowest values of probiotic bacteria survival were obtained for microdispersion 4, for which the reduction in numbers of LAB cells directly after encapsulation amounted to 2.97 log CFU g⁻¹ and 4.24 log CFU g⁻¹ after one month of storage at room temperature.

4. DISCUSSION

In our study, probiotic-loaded alginate microspheres were obtained with the emulsification technique. The obtained microspheres were characterized by smaller sizes than previously reported (Ji et al., 2019; Pupa et al., 2021; Seyedain-Ardabili et al., 2016). The use of microscale delivery systems may be the ideal solution for epidermal action, where an encapsulated ingredient is intended to act on the *stratum corneum*. In addition, using the emulsification technique, smaller capsules are obtained than in the case of extrusion, where the particles obtained are a few millimeters in size (Lin et al., 2016), and a better texture of the cosmetic is associated with it. On the other hand, too small size (nanoscale) would be unsuitable for micrometer-sized bacteria. Considering the above, when planning this experiment, it was assumed that the size of microspheres is the most desirable parameter of the experimental plan.

Based on the results of the design of the experiment (DOE), the input parameters that significantly affect the size of the microparticles are found in the rate of cross-linking agent solution drops addition and its concentration (in case of ultrasonication method). Alginate gels cross-link in the presence of divalent cations. Previous studies have shown that several divalent cations can bind to alginates with different affinities, which are on the order of Mg²⁺ < Mn²⁺ < Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ < Fe²⁺ < Ca²⁺ < Sr²⁺ < Ba²⁺ < Cd²⁺ < Cu²⁺ < Pb²⁺ (Li et al., 2007; Zhang et al., 2021). Moreover, in a study by Chan et al. (2011) gel strength was assessed. Gel strength expressed in Young's modulus showed that copper formed the strongest gels, followed by barium, strontium and calcium (Chan et al., 2011). Although cations such as barium and copper formed stronger gels with alginate in studies, calcium is the main cation used to cross-link alginates as it is considered clinically safe, readily available and economical (Łętocha et al., 2022; Reis et al., 2006). Therefore, in this study, calcium chloride was chosen as the source of divalent ions. In a study by Lotfipour et al. (2012) on the effect of calcium chloride concentration on bacterial microencapsulation in extrusion method, it was concluded that an increase in calcium chloride concentration (1–4%) had no significant effect on the size of the prepared balls. However, in our experimental plan based on microemulsification

method, in the case of ultrasonication, one of the statistically significant parameters turned out to be the concentration of the cross-linking agent. In addition, during the experiment, it was noticed that with the increasing concentration of calcium chloride, the number of formed microcapsules decreased. This is consistent with the research of Walczak et al. (2015), who found that the amount of hydrogel obtained decreased with increasing concentration of calcium chloride (0.05–0.7 mol/dm³), while the hardness of the microspheres increased. The decrease in cross-linking efficiency is probably related to the rapid exchange of ions on the surface of the droplet, which prevents the penetration of calcium cations into its interior (Walczak et al., 2015).

Literature sources indicated that increasing the mixing speed had a positive effect on reducing the size of microparticles. The high agitation speed produces finer microspheres due to the higher energy that ensures dispersion between the oil phase and the water phase in the emulsion (Łętocha et al., 2022; Zhai et al., 2013). On the contrary, our experimental method of emulsification (of high shear homogenization and ultrasonic homogenization) did not have an effect on the size of the obtained microspheres, in the tested area of the experiment. Most importantly, statistically significant input parameter appeared to be the dripping rate. This is in line with the research of Bennacef et al. (2022), who evaluated the properties of alginate capsules in the co-extrusion method. It was shown that the increase in the dripping rate significantly increased the diameters of the capsules, which can be explained by the fact that more material added to the capsule results in a larger diameter (Bennacef et al., 2022).

For further research, the ultrasonic homogenization process was used, due to the shorter time of preparation method. The data presented on the approximation profiles and saddle diagrams suggested that in order to obtain the smallest particles in the process of ultrasonic homogenization dripping rate and concentration of CaCl₂ should be in the range from 4 to 8 drop/min and 0.05 to 0.3 mol/dm³, respectively. Taking all this information into account, the final samples of microspheres (1, 2, 3) and stable microdispersion (4) were obtained using the dripping rate and crosslinker concentration of 10 drop/min and 0.3 mol/dm³, respectively. The ultrasonication amplitude was 69%. The efficiency of encapsulation was checked when using different centrifugation speeds (no centrifugation (1), 500 rpm (2) and 30 000 rpm (3)).

In order to obtain alginate microspheres and microdispersions with a fairly high LAB cell density, *L. casei* cell suspension with the density of 10.6 log CFU g⁻¹ was added to the alginate solution in the encapsulation process. The strategy was used to avoid a possible reduction in cell viability during sodium alginate cross-linking in calcium chloride. This approach resulted in a decrease in probiotic cells viability in the created structures (1, 2, 3, 4) in the range of 0.6–2.97 log CFU g⁻¹ compared to the original *L. casei* cell suspension used to obtain them. The lowest reduction in the number of LAB was found in microspheres 2 and 3, which amounted to

0.6 log CFU g⁻¹ and 1.38 log CFU g⁻¹, respectively. Slightly higher reduction values were obtained in microspheres 1 and microdispersion 4, which amounted to 1.38 log CFU g⁻¹ and 2.97 log CFU g⁻¹.

The reduction in *L. casei* cells may be associated with debonding and non-entrapment of LAB during the emulsification process applied. The decrease in LAB viability might also have been associated with the use of calcium chloride for the cross-linking of sodium alginate during the immobilization process. Its high concentration could have caused osmotic stress and contributed to the damage of bacterial cells (Lasta et al., 2021). The amplitude of ultrasounds used to obtain microspheres and microdispersion was not without significance for the survival of LAB. According to some authors, the level of reduction of the number probiotic bacteria cells depends on the intensity of ultrasonic waves and the duration of their use (Yeo and Liong, 2011). The mechanism of ultrasound-induced stress is mainly associated with the phenomenon of cavitation, ultimately leading to membrane permeabilization, cell lysis and lipid peroxidation of the cell membrane in probiotic bacteria (Hayer, 2010; Tang et al., 2008). The differences in LAB reduction can also result from the way of centrifugation.

Although some cells died during encapsulation, a large number of viable bacteria survived because they were enclosed in alginate structures, which corresponded to the microencapsulation efficiency *EE* within the range of 72–94%. Similar *EE* values (73.64%–94.1%) were obtained by Pupa et al. (2021), whose objective was to develop a double-encapsulated alginate (1.5%) and chitosan (0.5%) shell by extrusion, emulsion and spray drying methods using *Lactobacillus plantarum* strains 31F, 25F, 22F, *Pediococcus pentosaceus* 77F and *P. acidilactici* 72N. Slightly lower *EE* values within the range of 62.54–72.48% were obtained during encapsulation of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297 in the extrusion process by Rather et al. (2017). Even lower *EE* values within the range of 43–50% were obtained by encapsulation of (Zou et al., 2011).

It should be emphasized that different encapsulation methods can affect the values of LAB encapsulation and the viability of probiotic cells in different ways. According to some authors, the genus of probiotic strain used, the microcapsule size, the type of wall material used, the microbial cell load, as well as the time of curing in the calcium chloride solution may be essential for the above-mentioned parameters (Chávarri et al., 2010; Farias et al., 2019).

The assessment of *L. casei* survival in microspheres (1, 2, 3) and microdispersion (4) showed a reduction at the level of 1.47–3.1 log CFU g⁻¹ after 7 days of storage and 3.83–4.26 log CFU g⁻¹ after 30 days of storage. It should be highlighted, however, that the lowest LAB reduction was found in the case of microspheres 2 and microspheres 3, which amounted to 1.47 log CFU g⁻¹ and 1.8 log CFU g⁻¹ after 7 days, and 3.83 log CFU g⁻¹ and 4.21 log CFU g⁻¹, respectively. A higher LAB reduction was found in microspheres 1

and microdispersion 4, which amounted to 2.08 log CFU g⁻¹ and 3.1 log CFU g⁻¹ after 7 days, and 4.26 log CFU g⁻¹ and 4.24 log CFU g⁻¹ after 30 days, respectively. The observed differences in *L. casei* survival mainly associated with the water content in the formulations and it is related to the method of the AMs systems obtaining. This is in accordance to Kim et al. (2017) and Sohail et al. (2013), whose observed that the reduction of water content in probiotic-loaded systems is the simplest way to increase the viability of LAB in microcapsules.

On the other hand, some authors suggest that the parameters such as: temperature, relative humidity, storage environment, wall material composition, and light exposure affect viability of the bacteria during storage of probiotic-loaded formulations (Meng et al., 2008; Morgan et al., 2006).

5. CONCLUSIONS

The subject of the work was the optimization of probiotic-loaded alginate microsphere production. The method of experimental design (DOE) was applied to select the most important process parameters affecting alginate microcapsule quality and probiotic bacteria viability. The statistical analysis provided an excellent tool to describe the parameters that significantly influenced the formation of alginate microparticles. The obtained results showed that the quality of AMs was mainly affected by the concentration and the rate of calcium chloride addition in to the system. Based on the DOE, stable microdispersion or microsphere samples were prepared by ultrasonification with the following parameters: calcium chloride concentration equal to 0.3 mol/dm³, the rate of CaCl₂ addition of 10 drop/min and the ultrasonication amplitude of 69%. *Lactobacillus casei* bacteria were encapsulated with high efficiency (72–94%) in the elaborated systems.

REFERENCES

- Al-Abboodi A., Zhang S., Al-Saady M., Ong J.W., Chan P.P.Y., Fu J., 2019. Printing *in situ* tissue sealant with visible-light-crosslinked porous hydrogel. *Biomed. Mater.*, 14, 045010. DOI: 10.1088/1748-605X/ab19fe.
- Arenales-Sierra I.M., Lobato-Calleros C., Vernon-Carter E.J., Hernández-Rodríguez L., Alvarez-Ramírez J., 2019. Calcium alginate beads loaded with Mg(OH)₂ improve *L. casei* viability under simulated gastric condition. *LWT*, 112, 108220. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.05.118.
- Asgari S., Pourjavadi A., Licht T.R., Boisen A., Ajalloueian F., 2020. Polymeric carriers for enhanced delivery of probiotics. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 161–162, 1–21. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.014.
- Bennacef C., Desobry-Banon S., Probst L., Desobry S., 2022. Optimization of core-shell capsules properties (Olive oil/alginate) obtained by dripping coextrusion process. *LWT*, 167, 113879. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113879.

- Chan E.S., Lim T.K., Voo W.P., Pogaku R., Tey B.T., Zhang Z., 2011. Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9, 228–234. DOI: [10.1016/j.partic.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.12.002).
- Chávarri M., Maraño I., Ares R., Ibáñez F.C., Marzo F., Vil-larón M.C., 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 142, 185–189. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022).
- Choukaife H., Doolaanea A.A., Alfatama M., 2020. Alginate nanoformulation: Influence of process and selected variables. *Pharmaceuticals*, 13, 335. DOI: [10.3390/ph13110335](https://doi.org/10.3390/ph13110335).
- Darjani P., Hosseini Nezhad M., Kadkhodae R., Milani E., 2016. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162–167. DOI: [10.1016/j.lwt.2016.05.032](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.032).
- Dhamecha D., Movsas R., Sano U., Menon J.U., 2019. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. *Int. J. Pharm.*, 569, 118627. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2019.118627](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627).
- Farias T.G.S.D., Ladislav H.F.L., Stamford T.C.M., Medeiros J.A.C., Soares B.L.M., Stamford Arnaud T.M., Stamford T.L.M., 2019. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT*, 100, 391–396. DOI: [10.1016/j.lwt.2018.10.084](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.084).
- Gomathi T., Susi S., Abirami D., Sudha P.N., 2017. Size optimization and thermal studies on calcium alginate nanoparticles. *IOSR J. Pharm.*, 48, 1–7.
- Guimarães R.R., Vendramini A.L.A., dos Santos A.C., Leite S.G.F., Miguel M.A.L., 2013. Development of probiotic beads similar to fish eggs. *J. Funct. Foods*, 5, 968–973. DOI: [10.1016/j.jff.2013.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.002).
- Hayer K., 2010. The effect of ultrasound exposure on the transformation efficiency of *Escherichia coli* HB101. *Biosci. Horiz.*, 3, 141–147. DOI: [h10.1093/biohorizons/hzq018](https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzq018).
- Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., 2015. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J. Food Sci. Technol.*, 52, 4679–4696. DOI: [10.1007/s13197-014-1516-2](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1516-2).
- Ji R., Wu J., Zhang J., Wang T., Zhang X., Shao L., Chen D., Wang J., 2019. Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Front. Microbiol.*, 10, 1389. DOI: [10.3389/fmicb.2019.01389](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01389).
- Kim J.U., Kim B., Shahbaz H.M., Lee S.H., Park D., Park J., 2017. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 52, 519–530. DOI: [10.1111/ijfs.13308](https://doi.org/10.1111/ijfs.13308).
- Kim S., Jeong C., Cho S., Kim S.B., 2019. Effects of thermal treatment on the physical properties of edible calcium alginate gel beads: Response surface methodological approach. *Foods*, 8, 578. DOI: [10.3390/foods8110578](https://doi.org/10.3390/foods8110578).
- Lasta E.L., da Silva Pereira Ronning E., Dekker R.F.H., da Cunha M.A.A., 2021. Encapsulation and dispersion of *Lactobacillus acidophilus* in a chocolate coating as a strategy for maintaining cell viability in cereal bars. *Sci. Rep.*, 11, 20550. DOI: [10.1038/s41598-021-00077-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-00077-0).
- Lebeer S., Oerlemans E., Claes I., Wuyts S., Henkens T., Spacova I., van den Broek M., Tuytaerts I., Wittouck S., De Boeck I., Allonsius C.N., Kiekens F., Lambert J., 2018. Topical cream with live lactobacilli modulates the skin microbiome and reduce acne symptoms. *bioRxiv*. 463307. DOI: [10.1101/463307](https://doi.org/10.1101/463307).
- Lengyel M., Kállai-Szabó N., Antal V., Laki A.J., Antal I., 2019. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci. Pharm.*, 87, 20. DOI: [10.3390/sci-pharm87030020](https://doi.org/10.3390/sci-pharm87030020).
- Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., 2022. Preparation and characteristics of alginate microparticles for food, pharmaceutical and cosmetic applications. *Polymers*, 14, 3834. DOI: [10.3390/polym14183834](https://doi.org/10.3390/polym14183834).
- Łętocha A., Miastkowska M., Sikora E., 2023. Sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne. Patent No. P.443812.
- Li L., Fang Y., Vreeker R., Appelqvist I., Mendes E., 2007. Reexamining the egg-box model in calcium – Alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8, 464–468. DOI: [10.1021/bm060550a](https://doi.org/10.1021/bm060550a).
- Lin S., Chen Y.-C., Chen R.-N., Chen L.-C., Ho H.-O., Tsung Y.-H., Sheu M.-T., Liu D.-Z., 2016. Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *PLoS ONE*, 11, e0153685. DOI: [10.1371/journal.pone.0153685](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153685).
- Lotfipour F., Mirzaei S., Maghsoodi M., 2012. Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Adv. Pharm. Bull.*, 2, 71–78. DOI: [10.5681/apb.2012.010](https://doi.org/10.5681/apb.2012.010).
- Mao Y., Chen X., Xu B., Shen Y., Ye Z., Chaurasiya B., Liu L., Li Y., Xing X., Chen D., 2019. Eprinomectin nanoemulgel for transdermal delivery against endoparasites and ectoparasites: preparation. *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Delivery*, 26, 1104–1114. DOI: [10.1080/10717544.2019.1682720](https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1682720).
- Martău G.A., Mihai M., Vodnar D.C., 2019. The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector – Biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers*, 11, 1837. DOI: [10.3390/polym11111837](https://doi.org/10.3390/polym11111837).
- Martins E., Poncelet D., Rodrigues R.C., Renard D., 2017. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *J. Microencapsulation*, 34, 754–771. DOI: [10.1080/02652048.2017.1403495](https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495).
- Meng X.C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C., Ross R.P., 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.*, 106, 1406–1416. DOI: [10.1016/j.foodchem.2007.04.076](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076).
- Miastkowska M., Kulawik-Pióro A., Szczurek M., 2020. Nanoemulsion gel formulation optimization for burn wounds: Analysis of rheological and sensory properties. *Processes*, 8, 1416. DOI: [10.3390/pr8111416](https://doi.org/10.3390/pr8111416).

- Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G., 2006. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods*, 66, 183–193. DOI: [10.1016/j.mimet.2006.02.017](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017).
- Paques J.P., 2014. *Formation of alginate nanospheres*. Wageningen University. Available at: <https://edepot.wur.nl/287134>.
- Pupa P., Apiwatsiri P., Sirichokchatchawan W., Pirarat N., Muangsin N., Shah A.A., Prapasarakul N., 2021. The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Sci. Rep.*, 11, 13753. DOI: [10.1038/s41598-021-93263-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-93263-z).
- Puscaselu R.G., Lobiuc A., Dimian M., Covasa M., 2020. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers*, 12, 2417. DOI: [10.3390/polym12102417](https://doi.org/10.3390/polym12102417).
- Rather S.A., Akhter R., Masoodi F.A., Gani A., Wani S.M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT*, 83, 50–58. DOI: [10.1016/j.lwt.2017.04.036](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036).
- Reis C.P., Neufeld R.J., Vilela S., Ribeiro A.J., Veiga F., 2006. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J. Microencapsulation*, 23, 245–257. DOI: [10.1080/02652040500286086](https://doi.org/10.1080/02652040500286086).
- Ryś M., Miastkowska M., Sikora E., Łętocha A., Krajewska A., Synowiec A., 2022. Bio-herbicidal potential of nanoemulsions with peppermint oil on barnyard grass and maize. *Molecules*, 27, 3480. DOI: [10.3390/molecules27113480](https://doi.org/10.3390/molecules27113480).
- Seyedain-Ardabili M., Sharifan A., Tarzi B.G., 2016. The production of synbiotic bread by microencapsulation. *Food Technol. Biotechnol.*, 54, 52–59. DOI: [10.17113/ftb.54.01.16.4234](https://doi.org/10.17113/ftb.54.01.16.4234).
- Shafizadeh A., Golestan L., Ahmadi M., Darjani P., Ghorbani-HasanSarai A., 2020. Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *J. Food Meas. Charact.*, 14, 1901–1908. DOI: [10.1007/s11694-020-00437-w](https://doi.org/10.1007/s11694-020-00437-w).
- Shalaka D., Naik S.R., Amruta A., Parimal K., 2009. Vitamin E loaded pectin alginate microspheres for cosmetic application. *J. Pharm. Res.*, 2, 1098–1102.
- Sheu T.Y., Marshall R.T., 1993. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.*, 58, 557–561. DOI: [10.1111/j.1365-2621.1993.tb04323.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04323.x).
- Sikora E., Miastkowska M., Lasoń E., 2020. *Selected skin delivery systems*. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej.
- Sohail A., Turner M.S., Coombes A., Bhandari B., 2013. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in alginate and maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 2763–2769. DOI: [10.1007/s11947-012-0938-y](https://doi.org/10.1007/s11947-012-0938-y).
- Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P., Kailasapathy K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 47–55. DOI: [10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9).
- Tang W., Liu Q., Wang X., Mi N., Wang P., Zhang J., 2008. Membrane fluidity altering and enzyme inactivating in sarcoma 180 cells post the exposure to sonoactivated hemato-porphyrin *in vitro*. *Ultrasonics*, 48, 66–73. DOI: [10.1016/j.ultras.2007.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ultras.2007.10.002).
- Tønnesen H.H., Karlsen J., 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28, 621–630. DOI: [10.1081/DDC-120003853](https://doi.org/10.1081/DDC-120003853).
- Tyagi V.V., Kaushik S.C., Tyagi S.K., Akiyama T., 2011. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 15, 1373–1391. DOI: [10.1016/j.rser.2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.10.006).
- Van Vlierberghe S., Graulus G.-J., Keshari Samal S., Van Nieuwenhove I., Dubruel P., 2014. 12 – Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair, In: Netti P.A. (Ed.), *Biomedical foams for tissue engineering applications*. Woodhead Publishing Limited, 335–390. DOI: [10.1533/9780857097033.2.335](https://doi.org/10.1533/9780857097033.2.335).
- Walczak J., Marchewka J., Laska J., 2015. Hydrogels based on ionically and covalently crosslinked alginates. *Engineering of Biomaterials*, 18, 17–23.
- Wang B., Wan Y., Zheng Y., Lee X., Liu T., Yu Z., Huang J., Ok Y.S., Chen J., Gao B., 2019. Alginate-based composites for environmental applications: a critical review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 49, 318–356. DOI: [10.1080/10643389.2018.1547621](https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1547621).
- Wyłębska Ł., Szuster L., Stawska H., 2014. Synteza i aplikacja nowych pochodnych wybranych polisacharydów. Część I: Przegląd literatury. *Technologia i Jakość Wyróbów*, 59, 3–16.
- Yang M., Liang Z., Wang L., Qi M., Luo Z., Li L., 2020. Microencapsulation delivery system in food industry – challenge and the way forward. *Adv. Polym. Technol.*, 2020, 7531810. DOI: [10.1155/2020/7531810](https://doi.org/10.1155/2020/7531810).
- Yeo S.K., Liong M.T., 2011. Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 885–897. DOI: [10.1021/jf103974d](https://doi.org/10.1021/jf103974d).
- Zhai P., Chen X.B., Schreyer D.J., 2013. Preparation and characterization of alginate microspheres for sustained protein delivery within tissue scaffolds. *Biofabrication*, 5, 015009. DOI: [10.1088/1758-5082/5/1/015009](https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015009).
- Zhang H., Cheng J., Ao Q., 2021. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Mar. Drugs*, 19, 264. DOI: [10.3390/md19050264](https://doi.org/10.3390/md19050264).
- Zou Q., Zhao J., Liu X., Tian F., Zhang H., Zhang H., Chen W., 2011. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46, 1672–1678. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x).

Probiotics-Loaded Microspheres for Cosmetic Applications

Anna Łętocha ^{1,*}, Alicja Michalczyk ², Paulina Ostrowska ², Małgorzata Miastkowska ¹ and Elżbieta Sikora ^{1,*}

¹ Department of Chemical Engineering and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Krakow, Poland; malgorzata.miastkowska@pk.edu.pl

² Lukasiewicz Research Network-Institute of Industrial Organic Chemistry, 03-236 Warsaw, Poland; alicja.michalczyk@ipo.lukasiewicz.gov.pl (A.M.); paulina.ostrowska95@wp.pl (P.O.)

* Correspondence: anna.letocha@doktorant.pk.edu.pl (A.Ł.); elzbieta.sikora@pk.edu.pl (E.S.)

Abstract: Probiotic bacteria confer health benefits to their host, support the intestinal microbiome and fight antibiotic resistance. Probiotic products are used in the food and pharmaceutical industries and, in recent years, have become increasingly popular in the cosmetic industry. However, in the case of cosmetics, it is difficult to meet microbiological requirements while maintaining viable cells. The aim of this research study was to develop an effective way of introducing live bacteria (a strain of *L. casei*) into cosmetic formulations. A method of encapsulation of the bacteria was used to increase their viability. As part of the results, the effective carriers for the strain of *L. casei* are reported. Alginate microspheres were prepared for the systems to protect the microorganisms against external factors, such as temperature, UV light and preservatives. The obtained probiotic-loaded alginate microspheres were then used as the active ingredient of cosmetic formulations. Additionally, a preservative system was carefully selected to ensure the microorganisms' viability and the microbiological stability of the products. The obtained results showed a significant improvement in the survival of the microencapsulated probiotic strain in the cosmetic formulations containing antimicrobial agents (6.13 log CFU/g after 120 days of storage) compared with the formulation containing the non-immobilised probiotic strain, where complete elimination of bacterial cells was observed.

Keywords: alginate microspheres; alginate carriers; probiotics; cosmetic formulations; *Lactobacillus casei*; preservatives



Citation: Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Ostrowska, P.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Probiotics-Loaded Microspheres for Cosmetic Applications. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 1183. <https://doi.org/10.3390/app14031183>

Academic Editor: Ramona Iseppi

Received: 30 December 2023

Revised: 16 January 2024

Accepted: 18 January 2024

Published: 31 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

According to the generally accepted definition established by the FAO/WHO, “probiotics are live microorganisms that, when administered in appropriate amounts, provide the host with health benefits” [1–4]. In the case of the food and pharmaceutical industries, probiotics are used as active ingredients to regulate the intestinal microbiota or to fight antibiotic resistance [5–7]. However, in cosmetic products, live microorganisms can only be used in a very limited dose because of the safety and requirements of cosmetic products (Regulation No. 1223/2009 on cosmetic products) [1]. Preservatives are used in order to obtain the proper microbiological purity of cosmetics, and as a result, it is difficult to maintain live probiotic bacteria in the formulation. As an alternative, the metabolites of probiotic bacteria have thus far been applied as cosmetic raw materials, i.e., fermentation products, cell lysates, raw materials after tyndyisation and the filtrates of fermentation products [4,8,9].

The use of the microencapsulation process can overcome the problem of the incompatibility of preservatives and extend the life of bacteria in skin care products [10]. “Microparticle” is the term used to refer to spherical particles with diameters ranging from 1 µm to 1000 µm. Polymer microparticles are usually formed using a polymer matrix, in which the active substance is immobilised [11,12]. Alginate microparticles are biodegradable, biocompatible and non-toxic active-substance delivery systems. The raw material used to obtain the particles is alginate, which is a polysaccharide obtained from marine algae composed of

molecules of D-mannuronic and L-guluronic acid connected by a glycosidic bond [13–16]. Most of the scientific literature focuses on the application of alginate microparticles in food applications, pharmaceutical applications [13,17–19] and recently also in environmental applications [20]. However, their potential for use in cosmetic formulations is a scientific area that needs to be explored. Among other options, active ingredients enclosed in alginate microparticles may be live strains of both predatory bacteria with an antimicrobial potential (*Bdellovibrio bacteriovorus*) [21,22], as well as probiotics [23–25].

Lactobacillus casei is a probiotic bacterium that is known for its potential health benefits, including its role in promoting skin health. *L. casei* may contribute to the maintenance of the skin barrier by enhancing the production of ceramides and other lipids which play a crucial role in skin integrity and help protect the skin against moisture loss, which is essential for its elasticity and comfort [26,27]. Probiotics may exert anti-inflammatory effects by inhibiting the toxic effects of certain pathogenic bacteria on the skin, which could be beneficial for inflammatory skin conditions [28]. Some studies suggest that probiotics, including *Lactobacillus casei*, may offer protection against the harmful effects of UV radiation, potentially reducing the risk of photoaging [29].

Lactobacillus casei is often associated with promoting gastrointestinal health. It may contribute to the balance of the gut microbiota and help maintain a healthy digestive system [30]. Some studies suggest that *L. casei* may play a role in modulating the immune system, potentially enhancing its response to various challenges, such as those associated with vaccinations [31].

Additionally, *L. casei* is a strain of bacteria commonly employed in food fermentation processes, such as the production of probiotic dairy products, including yogurts and fermented milks, where it contributes to both health benefits and the development of desirable product characteristics, enhancing both flavour and texture [32]. A probiotic strain is commonly used in the production of supplements, providing a convenient way for individuals to incorporate beneficial bacteria into their diet for potential health benefits [33].

In our previous studies, the production process of probiotic bacteria-loaded alginate microspheres was optimised. The most important process parameters affecting both the quality of the alginate microspheres and the efficiency of the encapsulation of probiotic bacteria were selected using the method of experimental design (DOE) [10]. The aim of our current study was to provide evidence that the microencapsulation process can overcome the problem of the incompatibility of probiotic bacteria with cosmetic preservatives and can also enhance the viability of probiotic bacteria inserted into skin care products. Alginate microspheres containing a *Lactobacillus casei* strain were obtained and then introduced into preserved cosmetic formulations. The influence of both the kind and concentration of the preservative on the survival of the *L. casei* strain in the prepared cosmetic was evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Alginic acid sodium salt from brown algae, sodium citrate, MRS broth and MRS agar (de Man Rogosa Sharpe) were purchased from Sigma Aldrich (Poznań, Poland). The *Lactobacillus casei* strain ATCC 393 was bought from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). NatraGem™ (INCI: Glyceryl Stearate, Polyglyceryl-6 Palmitate/Succinate and Cetearyl Alcohol) and Arlace™ 2121 (INCI: Sorbitan Stearate and Sucrose Cocoate) were kindly supplied by Croda (Kraków, Poland). Meadowfoam seed oil was bought from Piping Rock Health Products (Ronkonkoma, NY, USA). The tested preservatives, Parb Free 4HAP (INCI: Hydroxyacetophenone), Parb Free PE91 (INCI: Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerin) and Parb Free DHN (INCI: Sodium Dehydroacetate), were kindly supplied by Alfa Sagittarius (Kraków, Poland), and PeridolM (INCI: Methylparaben), PeridolP (INCI: Propylparaben) and Dekaben DHA (INCI: Dehydroacetic acid) were kindly supplied by IMCD (Warszawa, Poland). Dermosoft® 1388 (INCI: Aqua, Glycerin, Sodium Levulinate and Sodium Anisate) was obtained from Evonik Industries AG (Essen, Germany),

and sodium benzoate and xanthan gum were bought from Warchem (Zakręt, Poland). Deionised water was used as a solvent.

2.2. Preparation of *L. casei* Suspension

The lyophilised culture of the *Lactobacillus casei* ATCC 393 (LAB) strain was transferred to MRS broth and then incubated at 30 °C under aerobic conditions for 48 h. The cells were harvested in the log phase of growth by 3000 × g centrifugation for 10 min at 4 °C. In the next stage, the cells were washed twice with sterile saline (0.9%) (*w/v*). Cell pellets were resuspended in saline solution in order to obtain concentrations ranging from 10 log CFU/g to 13 log CFU/g. The bacterial cell count in the cell suspension was determined by counting the cells on plates in MRS agar (37 °C, 72 h culture) using the pour plate inoculation technique [34]. The obtained *L. casei* suspensions were used to prepare microcapsules.

2.3. Encapsulation of Probiotics

The encapsulation of the probiotics (*Lactobacillus casei* bacteria) was performed according to the methodology described in our previously published article [10] and patent application P. 443812 [35]. Briefly, a pre-emulsion was prepared by mixing the encapsulating material (2% sodium alginate solution and bacterial suspension in a 4:1 ratio) with capric/caprylic triglycerides and 1% ECO-Tween 80. An aqueous calcium chloride solution was added drop by drop to the solution in order to cross-link the microspheres. For the purposes of separating the obtained microspheres from the microdispersion, a centrifugation process was then conducted (EBA 20 by Hettich Zentrifugen). The composition and production methodology of the microspheres have been precisely described in our previous studies [10]. For further tests, we selected samples of the microspheres without centrifugation (1); microspheres spun at 500 rpm (2) and 30,000 rpm (3); and a stable microdispersion (4).

2.4. Assessment of the Viability of Free and Encapsulated Probiotic Cells Depending on the Influence of Temperature, pH, UV Radiation and Preservatives

Aqueous solutions containing 0.9% sodium chloride (*w/v*) were prepared, and their pH level was adjusted to the values of 2.0, 5.5 and 9.0 with sterile 1 mol/L HCl or NaOH as well as the preservative solution—sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid. In order to assess the survivability of bacteria in solutions with different pH values and the preservative solution, 1 g of encapsulated probiotics containing 9–11 log CFU of LAB cells was mixed with 9 mL of prepared solutions and incubated at room temperature (20 °C) for 15, 30 and 60 min. After incubation, the capsules were collected and put into 9 mL of 0.2 mol/L sterile sodium citrate (pH = 6). Cell viability was assessed through pour plate inoculation and the counting of bacterial cells grown on plates with MRS agar at 37 °C for 72 h under aerobic conditions [36].

A similar test was performed using free cells in order to compare the viability of free and encapsulated probiotic cells under similar conditions. A volume of 1 g of cell suspension with the live cell count amounting to 12.6 log CFU/g was mixed with 9 mL of the preservative solutions at various pH values. After incubation (15, 30 and 60 min), cell viability was assessed in line with the methodology described above.

In the experiments related to the assessment of the influence of temperature and UV light, free and encapsulated probiotic cells were kept at 40 °C for 1 h and 96 h and at 50 °C for 10 min and were treated with UV light. The assessment of the impact of UV radiation on microcapsules was made according to the methodology proposed by Khorramvatan et al. [37] with minor modifications. Samples (5 g) of each microencapsulated and free cell suspension (control) were placed on glass Petri dishes. The plates were then exposed to long-term UVB irradiation (311 nm) for 24 and 48 h. The UV sources were located 20 cm from each sample. Next, 1 g of encapsulated cells or 1 g of free cell suspension (initial density: 12.6 log CFU/g), stored under the conditions described above, was placed into 9 mL of 2 mol/L sterile sodium citrate (pH = 6) or 0.9% sodium chloride (*w/v*), respectively.

After a series of dilutions, the viability of free and encapsulated cells was determined and compared. The same procedure was applied to microcapsules and free bacterial cells exposed to specific temperature conditions. The experiments were repeated two times, and the results were used to calculate the average of log reduction. LAB cell reduction was calculated as the difference between the initial number of free LAB cells or LAB cells contained in the microspheres (No) and the number of free LAB cells or LAB cells contained in the microspheres exposed to physicochemical factors for a specific time (Nt).

2.5. The Influence of Various Preservative Systems on the Viability of Probiotics in Cosmetic Formulations

The microspheres with surviving *L. casei* strain bacteria were introduced into cosmetic formulations preserved with different antibacterial systems to compare them with previously used versions (a mixture of sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid). Table 1 shows the compositions of the antimicrobial agents used, and the base formulation (E1) is described in Table 2. The tests used the maximum permissible concentrations of antimicrobial agents selected on the basis of Annex V to Regulation (EC) No. 1223/2009 of 30 November 2009 [38] and the safety data sheets of raw materials. Based on previous experience, a mixture of preservatives (samples 1P and 2P) was used for the first two systems due to its comprehensive antimicrobial effect.

Table 1. Composition of preservative systems.

Sample No.	Trade Name	INCI Name	Concentration of Preservative Used in Emulsions [%]
1P	Dermosoft 1388	Aqua, Glycerin, Sodium Levulinate and Sodium Anisate	4
	Sodium benzoate	Sodium benzoate	0.5
2P	Dekaben DHA	Dehydroacetic acid	0.6
	Sodium benzoate	Sodium benzoate	0.5
3P	Parb Free 4HAP	Hydroxyacetophenone	1
4P	Parb Free PE91	Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerin	1
5P	Peridol M	Methylparaben	0.4
	Peridol P	Propylparaben	0.4
6P	Parb Free DHN	Sodium dehydroacetate	0.6

Table 2. General composition of base formulation (E1).

Phase	Component	Concentration [%]
A	Aqua	up to 100
	Emulsifier	2.0–5.0
	Thickener	0.2
	Preservative	* q.s.
B	Emulsifier	3.0–7.5
	Emollient	15.0

* According to suppliers' data (Table 1).

2.6. Preparation of Cosmetic Emulsions with Microspheres Including Probiotics and Selected Preservative System

An O/W base emulsion (E1) with a selected preservative system was prepared. In order to evaluate the protection effect on probiotic bacteria viability through the encapsulation process, two other formulations were prepared based on emulsion E1, the emulsion containing a non-encapsulated *L. casei* strain (E2 emulsion) and bacteria-loaded microspheres (E3 emulsion). Table 2 shows the general composition of the base formulation (E1). The exact composition of the formulations is protected by patent application P. 445990 [39].

The emulsions were prepared by heating the water and oil phases separately at 70 °C and stirring with a magnetic stirrer at 600 rpm (IKA C-MAG HS 7). When both phases reached the same temperature, the oil phase was slowly added to the water phase with mechanical stirring at a temperature of 70 °C at a stirring speed of 600 rpm for $t = 15$ min. The active ingredients—probiotic strain or probiotics-loaded microspheres—were added after cooling to a temperature below 40 °C. Subsequently, the system was continuously stirred and cooled up to 25 °C. The pH was then checked and adjusted by adding citric acid. The formulations were stored in glass containers at 25 °C.

2.7. Study of the Physicochemical Properties of Cosmetic Emulsions

The stability of the obtained emulsions was evaluated by centrifugation test and thermal stability test. In the first method, 2 mL samples of the formulations were submitted to centrifugation at 3500 rpm for a duration of 10 min (EBA 20 Hettich Zentrifugen). The formulations were then checked organoleptically for any changes indicating destabilisation, e.g., delamination. In the second method, the emulsions were placed for 24 h in an incubator (+40 °C) and refrigerated at −20 °C. The studies were conducted over three cycles [40]. At the end of the cycles, the samples were checked to verify that no phase separation had occurred. Additionally, the stability of the products was visually observed at room temperature over a period of three months.

The pH values were checked using a Mettler Toledo Seven Easy pH meter equipped with a glass Inlab 410 electrode. A dilution test was applied to determine the type of the emulsion as oil in water (O/W) or water in oil (W/O). For this purpose, a small amount of the emulsion to be tested was placed on two watch glasses. Water was then added drop by drop to one of them, and a small amount of oil was added to the other; then, the miscibility of the drops was observed. If they were dispersed in the water phase, then this was an O/W emulsion, because easy dispersion can only occur in a continuous phase [41].

The rheological study of the products was performed using a Brookfield Model R/S Plus device equipped with the cone/plate (C-25-2) system, in the shear rate range of 1 to 100 s^{-1} , at the temperature of 25 °C for 60 s. Each time, a small amount of the emulsion was placed on the measuring plate, and the measurement was conducted three times for each sample.

The average size of oil droplets in the formulations was measured by an optical microscope, Motic B1, equipped with a digital camera and connected to digital image processing software (Motic Images Plus 2.0). For this purpose, one drop of each emulsion was applied to a microscope slide and was then covered with a coverslip and observed through an objective lens at 40× magnification.

2.8. Viability of Microencapsulated *Lactobacillus casei* in Skin Care Product

The assessment of the viability of probiotic strains encapsulated in microspheres in the developed emulsions was conducted according to the methodology described by Lasta et al. [36] and used to assess the survival of *Lactobacillus acidophilus* cells encapsulated and introduced into cereal bars. Microspheres that showed the greatest resistance to unfavourable physicochemical parameters were selected to use as the active ingredients in emulsion 3. However, the system that guarantees the highest survival of probiotic bacteria was selected as a preservative. The viability of probiotic cells in cosmetic formulations containing the free *L. casei* strain (E2) and *L. casei* microspheres (E3) was assessed immediately after introduction into the cosmetic and then after periods of seven days, one month and four months. The experiments were repeated two times, and the results were used to calculate the average log reduction. Cell reduction was defined as the difference between the initial amount of free LAB cells introduced into the cosmetic formulation (E2) or the amount of cells contained in microcapsules introduced into the cosmetic formulation (E3) and the amount of cells in the E2 formulation or E3 formulation after various storage times.

2.9. Statistical Analysis

All data concerning the mean droplet size and viscosity of formulations and the viability of the *L. casei* strain in the microspheres and formulations were presented as the means of three different experiments $\pm$ SDs. Differences between the calculated means of each individual group were determined by one-way ANOVA tests, using statistical software Statistica Version 12 (StatSoft Company, Kraków, Poland). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. The Influence of Physicochemical Parameters on Free and Encapsulated *Lactobacillus casei* Bacteria

The suspensions of the *L. casei* strain and the microspheres obtained by centrifugation at different speeds (1, 2 and 3) and microdispersion (4) were subjected to various physicochemical factors, such as a temperature of 40 °C for 10 min, 60 min and 96 h (Figure 1A); a temperature of 50 °C after 10 min (Figure 1B); acidic and alkaline pH (Figure 2); UV radiation for exposure times of 24 h and 48 h (Figure 3A); and preservatives—sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid (Figure 3B). A 0.2 mol/L sodium citrate solution with pH = 6 was used for the decapsulation process. The viability of free and encapsulated probiotic cells was assessed by counting bacterial colonies grown on MRS agar plates (incubation conditions: 37 °C, 72 h) after using the pour plate inoculation technique. The obtained results were expressed in log CFU/g. LAB cell reduction was calculated as the difference between the initial number of free LAB cells or LAB cells contained in the microspheres (No) and the number of free LAB cells or LAB cells contained in microspheres exposed to physicochemical agents for a given time (Nt): (No–Nt). In the case of assessing the effect of temperature (Figure 1), the duration of exposure to the free and encapsulated *L. casei* strain was selected based on trial-and-error analysis, which enabled the observation of visible differences in the survival of the free strain compared with the carriers used. In the case of 50 °C, it was impossible to observe differences over a longer period of time (60 min), because the samples were biodegradable.

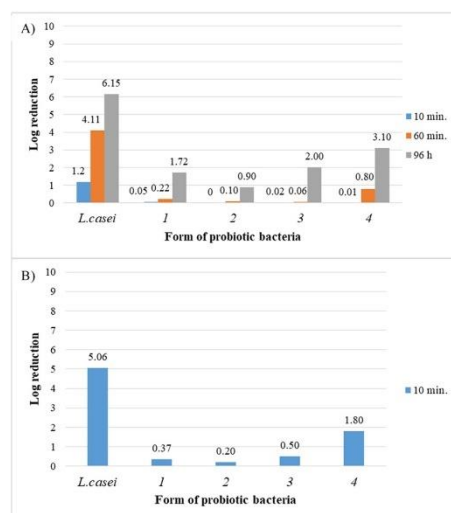


Figure 1. The effect of temperature on free and encapsulated *Lactobacillus casei* bacteria: (A) 40 °C and (B) 50 °C.

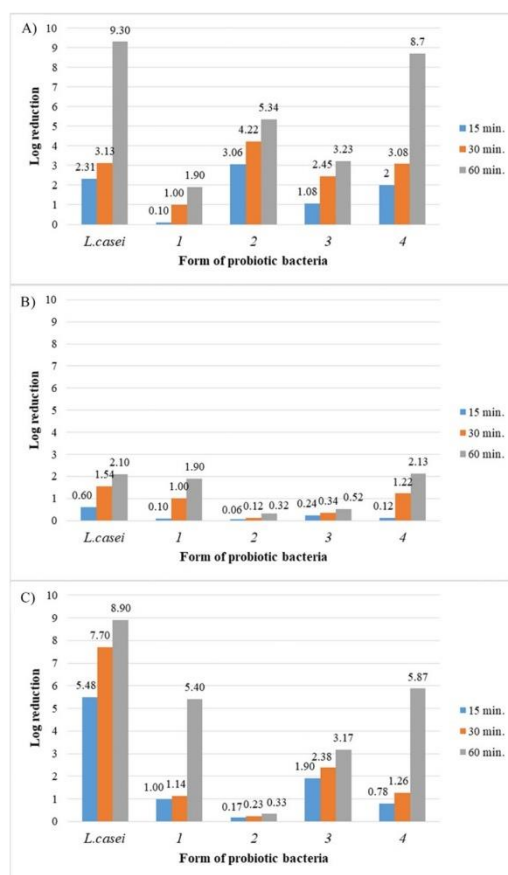


Figure 2. The effect of pH on free and encapsulated *Lactobacillus casei* bacteria: (A) pH = 2.0, (B) pH = 5.5 and (C) pH = 9.0.

It was shown that exposure of immobilised probiotic cultures in sodium alginate microspheres (samples 1, 2, 3 and 4) to a temperature of 40 °C for 10 and 60 min (Figure 1A) had no significant effect on cell viability. In the case of exposure to 40 °C for 10 min, the reduction was 0–0.05 log, and after 60 min, it was 0.06–0.8 log. Slightly greater decreases in the viability of LAB bacteria were found when the samples were exposed to a temperature of 40 °C for 96 h. The highest cell reduction was found for free *L. casei* cells (6.15 log) and microdispersion 4 (3.1 log). For the remaining samples (1, 2 and 3), LAB cell reduction was the lowest in microsphere 2 and amounted to 0.9 CFU log/g. For microsphere samples 1 and 3, the reduction levels were 1.72 CFU log/g and 2 CFU log/g, respectively.

A temperature of 50 °C for an exposure time of 10 min caused a reduction in the number of free *L. casei* cells of 5.06 log. The greatest decrease in the number of LAB bacteria was observed in the case of microdispersion 4, and it amounted to 1.80 log. In microsphere samples 1, 2 and 3, the decreases in viability were minimal and amounted to 0.37 log, 0.20 log and 0.50 log, respectively.

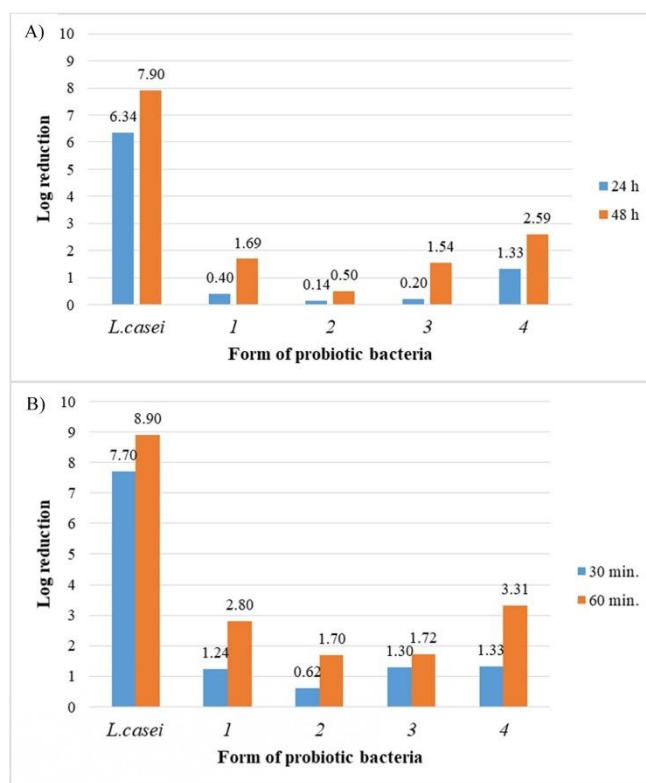


Figure 3. The effect of (A) UV radiation and (B) preservative on free and encapsulated *Lactobacillus casei* bacteria.

The next parameter assessed was pH, with values of 2.0, 5.5 and 9.0 after contact times of 15 min, 30 min and 60 min. In accordance with the literature [42], acidic and alkaline pH values were selected for testing (Figure 2A,C) in order to assess the positive effect of the carriers used on the probiotic strain. In turn, pH 5.5 (Figure 2B) was chosen due to the fact that it corresponds to the physiological pH of the skin, which is the site of the potential application of the product.

A pH value of 2 (Figure 2A) had an adverse effect on the viability of both free and sodium alginate-immobilised *L. casei* cells in samples 2, 3 and 4. The average values of LAB cell reduction were 1.08–3.06 log after 15 min, 2–4.22 log after 30 min and 3.23–8.7 log after 60 min for the above samples. The lowest reductions of live cells were found in microsphere sample 1 and were 0.1 log after 15 min, 1 log after 30 min and 1.9 log after 60 min.

The greatest cell reduction in the case of contact with pH = 5.5 (Figure 2B) was observed for the suspension of free *L. casei* cells, microsphere sample 1 and microdispersion 4. The reduction values of *L. casei* cells were within the ranges of 0.1–0.6 log after 15 min contact, 1–1.54 log after 30 min contact and 1.9–2.13 log after 60 min contact for the above-mentioned samples. The minimal reductions in LAB cells were observed for microsphere samples 2 and 3 and were in the ranges of 0.06–0.24 log after 15 min, 0.12–0.34 log after 30 min and 0.32–0.52 after 60 min.

The greatest tolerance to pH 9 (Figure 2C) after contact times of 15, 30 and 60 min was demonstrated by microsphere sample 2, for which the recorded decreases in LAB

viability were 0.17 log after 15 min, 0.23 log after 30 min and 0.33 log after 60 min. For the suspension of free LAB cells and the remaining samples (1, 3 and 4), the LAB reduction values were within the ranges of 0.78–5.48 log after 15 min, 1.14–7.70 log after 30 min and 3.17–8.9 log after 60 min.

The next parameters were the effect of UV radiation and the preservative system on free and encapsulated *L. casei*. The exposure time of UV radiation was selected according to the methodology of Pereira et al. [43] for comparative purposes, in which as a result of 6 h exposure to UV light, there was complete elimination of probiotic strains. In the case of tests, the UV exposure was extended to 24 and 48 h in order to illustrate the effectiveness of the carriers used on the probiotic *L. casei* strain. However, in the case of the effect of a preservative, this is the first study to check the effect of carriers containing microspheres with potential use in cosmetic products; therefore, the action time was selected experimentally. The maximum exposure time was 60 min, as this was the longest survival time of the free strain.

UV radiation after exposure times of 24 and 48 h had the most adverse effect on free *L. casei* cells, reducing the number of live cells by 6.34 log after 24 h and by 7.90 log after 72 h. The greatest decrease in the viability of encapsulated LAB bacteria was observed in microsphere sample 1 (0.4 log after 24 h and 1.69 log after 48 h) and microdispersion 4 (1.33 log after 24 h and 2.59 log after 48 h). In microsphere samples 2 and 3, the numbers of live cells which were decreased after 24 and 48 h were minimal and amounted to 0.14 log and 0.5 log (microsphere sample 2) and 0.2 log and 1.54 log (microsphere sample 3), respectively.

The influence of the preservative system (sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid), which was initially selected as a system that protects the cosmetic against microbiological degradation, was also assessed. The assessment was made after a contact time of 30 and 60 min. The greatest reductions in bacterial cells were observed in the case of the free *L. casei* cell suspension and were 7.70 log after 30 min and 8.90 log after 60 min.

The effects of the preservative system after both contact times in the case of microsphere samples 2 and 3 were relatively small, causing decreases in cell number of 0.62 log after 30 min and 1.7 log after 60 min (microsphere sample 2) and 1.3 log after 30 min and 1.72 log after 60 min (microsphere sample 3). For microsphere sample 1, the LAB reductions were 1.24 log after 30 min and 2.80 log after 60 min, and for microdispersions, 4–1.33 log after 30 min and 3.31 log after 60 min.

Microsphere sample 2 was characterised by the best survival of *L. casei* over time and also showed the highest resistance to unfavourable physicochemical parameters such as temperature, UV light, preservative system, and acidic and alkaline reactions compared with the other tested samples. Therefore, these microspheres were selected for further research aimed at selecting a preservative system and developing the composition of a cosmetic formulation containing live probiotic bacteria enclosed in microspheres. The obtained formulation was subjected to physicochemical assessment. The survival of the *L. casei* strain enclosed in microspheres was also checked immediately after the production of the cosmetic formulation, as well as after 7, 30 and 120 days of storage.

3.2. The Influence of Preservative Systems on the Viability of Probiotics in Cosmetic Formulations

This research study was aimed at assessing the impact of preservative systems (1P–6P) protecting the cosmetic formulation on the viability of the *L. casei* strain enclosed in selected microspheres over the considered time. The initial density of *L. casei* cells in the microspheres was 9.60 log CFU/g. The tests were performed according to the methodology included in Section 2.4., and the results obtained are presented in Table 3.

Table 3. The influence of preservation systems on the viability of the *L. casei* strain.

Sample No.	Immediately		After 7 Days		After 30 Days	
	Cell Viability * [log CFU/g]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU/g]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU/g]	Log Reduction
1P	9.34 ± 0.2	0.26	6.18 ± 0.8	3.42	6.06 ± 0.25	3.54
2P	7.29 ± 0.8	2.31	3.08 ± 0.2	6.51	2.30 ± 0.3	7.30
3P	NG	9.60	NG	9.60	NG	9.60
4P	3.26 ± 0.4	6.34	NG	9.60	NG	9.60
5P	3.94 ± 0.15	5.66	NG	9.60	NG	9.60
6P	3.90 ± 0.5	5.70	3.50 ± 0.15	6.10	2.08 ± 0.7	7.52

NG—no growth; * cell viability is the mean value of two replicates ±SD.

The maximum permissible concentrations of antimicrobial substances were used in the study. The use of the highest possible concentration of preservative should ensure, in addition to the survival of probiotic bacteria enclosed in microspheres, the microbiological stability of the product.

Among the tested systems, preservative system 1P had the weakest impact on the viability of the *L. casei* strain encapsulated in microspheres based on sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid. Compared with the initial density of the *L. casei* strain in the microspheres, the viability of the strain decreased by 0.26 log immediately after receiving the cosmetic formulation, by 3.42 log after 7 days and by 3.54 log after a one month. A slightly greater reduction in live *L. casei* cells was observed after the use of preservative systems 2P (dehydroacetic acid and sodium benzoate) and 6P (sodium dehydroacetate) in the cosmetic. In the case of preservative system 2P, immediately after receiving the cosmetic, the decrease in the number of bacterial cells was 2.31 log; after 7 days, it was 6.51 log; and after 30 days, it was 7.3 log. Preservative system 6P, immediately after creating the formulation, reduced the number of *L. casei* bacteria by 5.7 log. In the subsequent stages of the study, the decrease in cell number was even greater and amounted to 6.10 log, and after 30 days, it was 7.52 log. In the case of preservative systems 4P (phenoxyethanol and ethylhexylglycerin), 5P (methylparaben and propylparaben) and 3P (hydroxyacetophenone), the following probiotic cell reduction values were obtained immediately after receiving the cosmetic: 6.34 log, 5.66 log and 9.60 log. The cosmetic formulation containing preservative system 3 was not subjected to the assessment of the survival of *L. casei* cells contained therein after 7 and 30 days of storage due to their complete elimination already in the first stage of testing. In cosmetic formulations protected with preservative systems 4 and 5, after 7 days of storage, complete elimination of *L. casei* cells was found.

Based on the obtained results, system 1P—sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid—was selected for further research due to this variant ensuring the highest level of survival of probiotic bacteria. Additionally, this system was tested in previous studies for in vitro cytotoxicity, and the studies confirmed no negative impact on the viability of HaCaT cells [44].

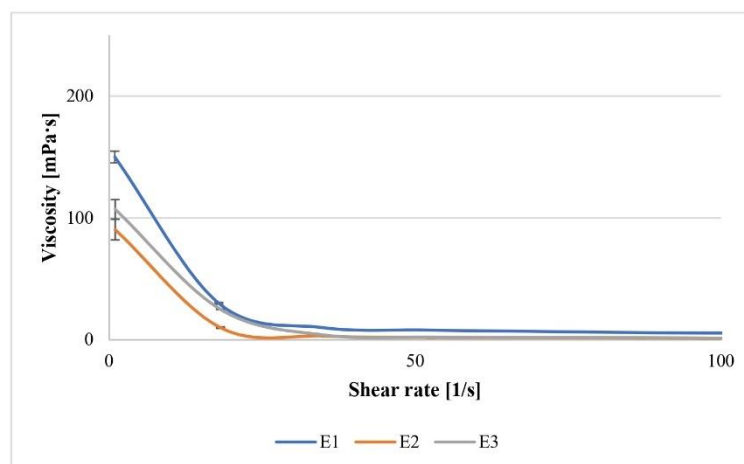
3.3. Physicochemical Properties of Skin Care Products

Three stable O/W emulsions containing probiotic ingredients were obtained. The *Lactobacillus casei* strain and microspheres containing *L. casei* were used as the active ingredients. A system consisting of sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid was used as a preservative. Samples were submitted to an accelerated stability study by centrifugation and to a thermal stress test in order to confirm that the homogeneity of the samples had not been altered. The obtained formulations were characterised by pH corresponding to the physiological skin pH. The mean droplet size of the internal phase of the emulsions was in the range of 8.6–12.4 µm. Table 4 describes the physicochemical properties of the prepared emulsions.

Table 4. Physicochemical properties of cosmetic emulsions.

	E1	E2	E
Centrifugation test	+	+	+
Thermal stability test	+	+	+
pH	5.8 (± 0.1)	5.8 (± 0.1)	5.8 (± 0.1)
Mean droplet size [μm]	10.6 (± 0.4)	8.60 (± 0.89)	12.40 (± 0.26)

In the next stage of the research study, the rheological properties of the prepared compositions were checked. Viscosity curves of the obtained emulsions with probiotic ingredients are shown in Figure 4.

**Figure 4.** Viscosity curves of the prepared emulsions ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 3$, $\pm\text{SD}$).

The data presented in Figure 4 indicate that the viscosity of the products decreases with the increase in the shear rate, which is characteristic of non-Newtonian, shear-thinning fluids. The obtained results show that the addition of the active ingredient did not significantly change the viscosity of the composition.

3.4. Assessment of the Survival of Probiotic Bacteria in Cosmetic Formulations

To confirm that bacterial encapsulation can overcome the problem of incompatibility of cosmetic preservatives and the viability of probiotics inserted into skin care products, two emulsions of the same composition but differing in the form of microorganism introduction—free form (E2 emulsion) or bacteria-loaded alginate microcapsules (E3)—were prepared, and Table 5 shows the viability of probiotic bacteria in these two cases (*Lactobacillus casei*). A system consisting of sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid was used as a preservative. The survival rate was assessed immediately after the production of the cosmetic formulation and after 7, 30 and 120 days of storage (Table 5).

Table 5. Viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus casei*) in cosmetic formulations.

Sample No.	Immediately after Preparation		After 7 Days		After 30 Days		After 120 Days	
	Cell Viability * [log CFU/g]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU/g]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU/g]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU/g]	Log Reduction
E2	10.74 ± 0.9	0.86	6.63 ± 0.5	4.97	4.8 ± 0.8	6.8	0	11.6
E3	8.51 ± 1.2	2.03	6.55 ± 0.4	3.99	6.25 ± 0.3	4.29	6.13 ± 0.9	4.41

* Cell viability is the mean value of two replicates ± SD.

The initial density of the *L. casei* strain that was included in the cosmetic formulation (E2) was 11.6 log CFU/g. In the case of assessing the viability of the free strain of *Lactobacillus casei* bacteria in the cosmetic formulation (E2), the number of *L. casei* cells decreased by 0.86 log immediately after preparing the cosmetic formulation. Slightly greater decreases in the viability of probiotic bacterial cells were observed after one week and one month of storage of the cosmetics and amounted to 4.97 log and 6.8 log, respectively. After 4 months of storage, complete inactivation of *L. casei* was found in the cosmetic formulation.

However, in the case of the cosmetic product containing microspheres with the *L. casei* strain (E3), the initial density of the *L. casei* strain in the microspheres was 10.54 log CFU/g. Immediately after the preparation of the emulsion, a 2.03 log decrease in the number of probiotic cells was observed. Tests performed at intervals of 7, 30 and 120 days of storage of the cosmetics revealed a reduction in the viability of bacterial cells in the range of 0.96–1.38 log compared with the initial value. Bacteria viability after 4 months was comparable to the control level. In the case of the formulation (E2) containing the “not protected” bacterial strain, the preservative system caused the complete elimination of probiotic cells. The obtained results enable the conclusion that encapsulation in the alginate microspheres ensures the survival of probiotic bacteria in the formulation, despite using the preservative system.

4. Discussion

4.1. Probiotic Bacterial Encapsulation as a Method of Protection from External Factors

It is generally known that external factors such as temperature, light exposure, relative humidity and wall material composition influence bacteria viability during storage of probiotics-loaded formulations [45,46]. Probiotic bacterial encapsulation may be an effective method of protecting the microorganisms against temperature, pH, UV light and other preservation systems.

Probiotics are very temperature-sensitive, and their death rate increases with temperature and is particularly severe above 51 °C [47,48]. In the case of the impact of high temperatures on the tested microcapsules, our results are consistent with the reports by other research groups [49]. As can be seen in Figure 1, even temperatures of 40 °C and 50 °C were not lethal to encapsulated *L. casei*, and cells encapsulated in carriers still showed significantly higher survival rates compared with non-encapsulated cells. Similarly, a high survival rate (90%) of the encapsulated *L. plantarum* strain was previously reported when researchers heat-treated the microcapsules at 50 °C for 20 min [50]. In the study by Abbaszadeh et al. [51], it was found that encapsulated bacteria survived significantly better ($p < 0.05$) than free cells when exposed to temperatures of 55, 60 and 65 °C. After exposure to heat at 65 °C for 30 min, the reduction in *L. rhamnosus* encapsulated in alginate and chitosan microspheres decreased by only 2.55 log, while the number of free cells decreased by approximately 5 log [51].

In our case, the developed alginate carriers ensure the isolation of probiotic strains (*L. casei*) due to the action of acidic and alkaline environments (pH = 2, 5.5 and 9). Moreover, in the case of microsphere samples 2 and 3, there were no significant differences in cell viability among different incubation times. However, in the case of the extreme pH

values of 2 and 9, after 60 min, there was the almost complete elimination of bacterial cells, while the use of microencapsulation increased the viability of the probiotic strain. These findings are consistent with those of other research groups [49,51,52]. In the study by Oberoi et al. [49], it was shown that encapsulated *L. rhamnosus* exhibited higher viability at different pH values in comparison with the non-encapsulated group. Consistent with previous reports by Kim et al. on the encapsulation of *L. acidophilus*, at pH = 1.2, the non-encapsulated strain was completely destroyed after 1 h of incubation, while the encapsulated cells maintained viability above 10^6 log CFU/mL at pH = 1.5 after 2 h [53]. Also, in the study by Haghshenas et al., it was found that non-encapsulated *Lactobacillus plantarum* 15HN was very sensitive to low-pH conditions and its viability was dramatically lost (from 9.76 ± 0.06 log CFU/g to 3.63 ± 0.03 log CFU/g), while the survival rate was approximately 37%. The microencapsulation process significantly increased the survival of probiotic bacteria, and the preparations showed a 1.3–1.7 log decrease in the number of CFU in cells with a survival rate of 82–86% [42].

Both the effects of preservatives and UV light can damage bacterial DNA, depending on the wavelength and exposure time [54]. Pereira et al. [43], in their studies, showed that a 6 h exposure of probiotic bacteria of the species *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* to UV radiation caused their almost complete elimination in aqueous solutions. There is relatively little information in the literature on the use of various methods of encapsulation of microorganisms or their spore forms as protection against the harmful effects of UV radiation. The results of our studies have shown that the use of alginate microspheres as the probiotic bacteria protection carriers significantly reduced the effect of harmful UVB radiation, with a wavelength of 311 nm. Even longer exposures (24 h and 48 h) to UVB radiation did not result in a significant reduction in the number of *L. casei* cells (0.14 log after 24 h and 0.50 log after 48 h).

Our results seem to be consistent with those of Khorramvatan et al. [37], who showed that from polymers such as starch, gelatine and sodium alginate used as coating materials, sodium alginate exhibited the best protective properties. Sodium alginate protected *Bacillus thuringiensis* spores to the greatest extent against the adverse effects of UVB and UVC radiation. Sodium alginate at all tested concentrations (2, 3 and 5%) allowed the viability of *Bacillus thuringiensis* spores to be maintained at the level of 72–90 after the exposure of microcapsules with live spores to ultraviolet radiation over the long term (UVB), for 24–168 h, while the viability of free spores of *B. thuringiensis* decreased to 40–70 during the time periods studied. However, at a concentration of 5%, sodium alginate enabled the viability of bacterial spores to remain unchanged at 80%, even after irradiation with ultraviolet light (UVC) over the short term for 5–25 min. The exposure of spores not protected with any coating material to the same conditions (UVC, time of 5–25 min) reduced their viability to 40–80%. In the case of our studies on the developed bacteria carriers, the efficiency of the alginate microcapsules in enhancing the survival parameters of bacterial cells were dependent on water content and were significantly lower in the case of the microdispersion in comparison with the isolated microspheres. The reduction in the water content in probiotics-loaded systems is the simplest way to increase the viability of microencapsulated LAB [10]. Among the developed systems, the most effective ones were the microspheres obtained after the separation of microcapsules from the solution with the use of centrifugation at 500 rpm. These alginate systems were applied as the active ingredients of the prepared probiotic cosmetic formulations.

4.2. Effect of Preservation System Properties on the Viability of Probiotic Bacteria in Probiotic Cosmetic Products

The microbiological purity of cosmetics and resistance to infections is a complex problem that is determined by the following factors: the quality and purity of ingredients (especially the quality of water); the hygiene of the technological process (organization of production and cleanliness of the devices used); the physicochemical properties of the final product; the type of the packaging and packaging materials; and the presence of microbial

inhibitors, i.e., preservatives [55]. Regulation (EC) No. 1223/2009 of 30 November 2009 [38] describes the requirements of the safety of cosmetic products. Among other stipulations, there are requirements regarding the microbiological purity of cosmetics. In order to obtain cosmetics of appropriate quality, various types of preservatives are used in products. Preservatives are ingredients added to cosmetics to protect the consumer and prevent microbiological contamination during normal and expected use of the cosmetic product. They demonstrate an antimicrobial effect, and when added to the cosmetic, they inhibit the development of bacteria, mould and fungi, thus extending the shelf life. The list of substances with antimicrobial activity and their permissible concentrations when used in cosmetic products are listed in Annex V to Regulation (EC) No. 1223/2009 of 30 November 2009 [38].

The most commonly used antibacterial preservatives can be divided according to their chemical composition, namely, organic acids and their derivatives, alcohols and phenols, aldehydes and formaldehyde-releasing agents, isothiazolinones, biguanides, quaternary ammonium compounds (QACs), nitrogen compounds, derivatives of heavy metals and inorganic compounds [56,57]. In general, the ideal preservative ingredient should be stable, compatible, effective at low levels, non-toxic, compliant with cosmetic regulations and inexpensive [58–60]. However, in the case of probiotics-loaded cosmetics, it is difficult to meet the above-mentioned microbiological requirements while maintaining viable cells. The aim of our study was to develop an effective method of introducing live bacteria (strain of *L. casei*) into formulations. It was important to select the adequate preservative system that would guarantee both of these requirements: to ensure the survival of probiotic bacteria in the microspheres and the protection of the products from pathogenic microorganisms, i.e., to ensure the microbiological purity and stability of the cosmetic formulations.

In the case of our research study, some preservatives from the group of organic acids and their derivatives were used, specifically dehydroacetic acid, salt of benzoic acid (sodium benzoate) and sodium levulinate—sodium salt of levulinic acid—combined with sodium salt of anisic acid, which are examples of “natural preservatives” [61]. Additionally, for comparison purposes, the most popular cosmetic preservatives were checked, namely, parabens (also belonging to the group of organic acid derivatives). Among alcohols, phenoxyethanol in combination with ethylhexylglycerin was used.

As an example of ketones, hydroxyacetophenone was selected. The antimicrobial effect of organic acid derivatives (sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid, or dehydroacetic acid and sodium benzoate) is related to the reduction in pH [62]. Acids and derivatives of organic acids, including benzoic acid and sorbic acid, inhibit the development of microorganisms through several mechanisms: firstly, they lower the pH of the external environment to values unfavourable for the development of microorganisms [63]; secondly, they cause acidification of the cytoplasm due to the penetration of uncharged organic acids into the cells (resulting in the internal pH causing their dissociation into anions, which results in the lowering of the internal pH), which affects the isoelectric pH of enzymes involved in glycolysis and active transport [62]. Alcohols and phenols (a system based on phenoxyethanol and ethylhexylglycerin) are agents with effective antimicrobial properties against both bacteria and fungi. Their action is bactericidal, especially in the case of acid-resistant mycobacteria. The mechanism of action of alcohol is related to protein denaturation or the inhibition of protein synthesis through several mechanisms [64]. Santos et al. [65] showed an effect of oxidative stress in *Pseudomonas putida* KT2440 as a result of exposure to phenol. At low concentrations, benzyl alcohol and phenoxyethanol lyse the bacterial cell membrane. In this way, they can denature the structure of proteins by binding to amino acid residues [66,67]. However, aldehydes also have a broad spectrum of activity against both bacteria and fungi. They can react with chemical groups (amine, amide, imine, thiol, carboxyl and hydroxyl substituents) on biomolecules, including proteins and DNA. This leads to protein aggregation, which results in their irreversible chemical modification, leading to the inhibition of metabolism and cell division [68,69].

In the case of the prepared cosmetic products containing probiotic microspheres, the systems based on organic acids and their derivatives (sodium benzoate combined with sodium salts of levulinic and anisic acid) turned out to be the most effective ones, as they had a weak impact upon the degradation of microspheres and upon the decrease in the viability of the probiotics of the *L. casei* strain enclosed in the carriers. After 120 days of storing the cosmetic, the survival of bacterial cells was comparable to that after 7 days (6.13 log CFU/g). This may be related to the high tolerance of *Lactobacillus* bacteria to an acidic environment because, as a result of metabolic changes, they produce lactic acid, thus lowering the pH [63]. However, in the case of the preservative system of the mixture of 4-parahydroxybenzoic acid derivatives (methyl ester and propyl ester), which also belong to derivatives of organic acids, no satisfactory probiotic survival effect was achieved, because after 7 days, there was complete elimination of bacterial cells. This may be related to the presence, in addition to the -COOH carboxyl group, of an additional -OH group, which makes their mechanism of action similar to the antimicrobial effect of alcohols.

5. Conclusions

The results showed that the encapsulation of bacteria in alginate microspheres could be an effective method of introducing live bacteria (strain of *L. casei*) into cosmetic formulations. Encapsulation enables the protection of microorganisms against external factors (temperature, UV light or preservatives) and, as a consequence, increases their viability. A significant improvement in the survival of the encapsulated probiotic strain in cosmetic formulations (6.13 log CFU/g after 120 days of storage) containing antimicrobial agents was observed in comparison with the formulations containing the non-encapsulated bacteria. Moreover, it has been shown that the selection of an appropriate preservative system is important in the case of cosmetics containing the probiotic strain of *L. casei*. For the developed products, systems based on organic acids and their derivatives proved to be the most effective antimicrobial agents because they had a weak impact on the degradation of microspheres; consequently, there was a decrease in the viability of the bacterial strain enclosed in alginate carriers. Taking into account the promising results, the elaborated technology may be an attractive approach to the development of long-stable cosmetic products containing live bacterial strains.

6. Patents

Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Sposób Otrzymywania Mikrokapsulek Zawierających Bakterie Probiotyczne. P.443812, 2023.

Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Formuacja Kosmetyczna Lub Dermokosmetyczna Zawierająca Bakterie Probiotyczne. P. 445990, 2023.

Author Contributions: Conceptualisation, A.L., A.M., M.M. and E.S.; methodology, A.L. and A.M.; formal analysis, A.L.; investigation, A.L., A.M. and P.O.; writing—original draft preparation, A.L., A.M., M.M. and E.S.; writing—review and editing, A.L. and E.S.; visualisation, A.L.; supervision, M.M. and E.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Łętocha, A.; Sikora, E. Pre- and Probiotics as Raw Materials for Cosmetic Products. In Proceedings of the EYEC Monograph: 9th European Young Engineers Conference, Online, 19–21 April 2021; Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology: Warszawa, Poland, 2021; pp. 47–51.

2. Ministry of Environment and Food of Denmark. *Survey of Cosmetic Products with “Probiotic” or “Prebiotic” Claims*; The Danish Environmental Protection Agency: Odense, Denmark, 2016.
3. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sfriso, R.; Egert, M.; Gempeler, M.; Voegeli, R.; Campiche, R. Revealing the Secret Life of Skin-with the Microbiome You Never Walk Alone. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 116–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lamberte, L.E.; van Schaik, W. Antibiotic Resistance in the Commensal Human Gut Microbiota. *Curr. Opin. Microbiol.* **2022**, *68*, 102150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Montassier, E.; Valdés-Mas, R.; Bataud, E.; Zmora, N.; Dori-Bachash, M.; Suez, J.; Elinav, E. Probiotics Impact the Antibiotic Resistance Gene Reservoir along the Human GI Tract in a Person-Specific and Antibiotic-Dependent Manner. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 1043–1054. [[CrossRef](#)]
7. Bai, X.; Zhu, M.; He, Y.; Wang, T.; Tian, D.; Shu, J. The Impacts of Probiotics in Eradication Therapy of Helicobacter Pylori. *Arch. Microbiol.* **2022**, *204*, 692. [[CrossRef](#)]
8. Roozen, M.; Serventi, L. Ingredients from Climate Resilient Crops to Enhance the Nutritional Quality of Gluten-Free Bread. *Foods* **2022**, *11*, 1628. [[CrossRef](#)]
9. Jung, Y.-O.; Jeong, H.; Cho, Y.; Lee, E.-O.; Jang, H.-W.; Kim, J.; Nam, K.T.; Lim, K.-M. Lysates of a Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus*, Can Improve Skin Barrier Function in a Reconstructed Human Epidermis Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4289. [[CrossRef](#)]
10. Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Design of Alginate Microspheres Formulation as a Probiotics Carrier. *Chem. Process Eng. New Front.* **2023**, *44*, 20. [[CrossRef](#)]
11. Campos, E.; Branquinho, J.; Carreira, A.S.; Carvalho, A.; Coimbra, P.; Ferreira, P.; Gil, M.H. Designing Polymeric Microparticles for Biomedical and Industrial Applications. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2005–2021. [[CrossRef](#)]
12. Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 3834. [[CrossRef](#)]
13. Puscaselu, R.G.; Lobiuc, A.; Dimian, M.; Covasa, M. Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers* **2020**, *12*, 2417. [[CrossRef](#)]
14. Choukaife, H.; Doolaanea, A.A.; Alfatama, M. Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 335. [[CrossRef](#)]
15. Van Vlierberghe, S.; Graulus, G.J.; Samal, S.K.; Van Nieuwenhove, I.; Dubrue, P. Porous Hydrogel Biomedical Foam Scaffolds for Tissue Repair. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, 2014; pp. 335–390. [[CrossRef](#)]
16. Gomathi, T.; Susi, S.; Abirami, D.; Sudha, P.N. Size Optimization And Thermal Studies on Calcium Alginate Nanoparticles. *IOSR J. Pharm.* **2017**, *48*, 1–7.
17. Yang, M.; Liang, Z.; Wang, L.; Qi, M.; Luo, Z.; Li, L. Microencapsulation Delivery System in Food Industry-Challenge and the Way Forward. *Adv. Polym. Technol.* **2020**, *2020*, 7531810. [[CrossRef](#)]
18. Dhamecha, D.; Movsas, R.; Sano, U.; Menon, J.U. Applications of Alginate Microspheres in Therapeutics Delivery and Cell Culture: Past, Present and Future. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118627. [[CrossRef](#)]
19. Martau, G.A.; Mihai, M.; Vodnar, D.C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector: Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers* **2019**, *11*, 1837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, B.; Wan, Y.; Zheng, Y.; Lee, X.; Liu, T.; Yu, Z.; Huang, J.; Ok, Y.S.; Chen, J.; Gao, B. Alginate-Based Composites for Environmental Applications: A Critical Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 318–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sason, G.; Jurkevitch, E.; Nussinovitch, A. Biological Control of Soft Rot in Potato by κ -Carrageenan Carriers Encapsulated Microbial Predators. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *107*, 81–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sáenz-Santos, C.M.; Opemipo Oyedara, O.; García-Tejeda, Y.V.; Romero-Bastida, C.A.; García-Oropesa, E.M.; Villalobo, E.; Rodríguez-Pérez, M.A. Active Biopolymeric Films Inoculated with *Bdellovibrio bacteriovorus*, a Predatory Bacterium. *Coatings* **2021**, *11*, 605. [[CrossRef](#)]
23. Asgari, S.; Pourjavadi, A.; Licht, T.R.; Boisen, A.; Ajalloueian, F. Polymeric Carriers for Enhanced Delivery of Probiotics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *161*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S.V. Technology and Potential Applications of Probiotic Encapsulation in Fermented Milk Products. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4679–4696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, J.U.; Kim, B.; Shahbaz, H.M.; Lee, S.H.; Park, D.; Park, J. Encapsulation of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* by Ionic Gelation with Electrostatic Extrusion for Enhancement of Survival under Simulated Gastric Conditions and during Refrigerated Storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 519–530. [[CrossRef](#)]
26. Parvez, S.; Malik, K.A.; Ah Kang, S.; Kim, H.Y. Probiotics and Their Fermented Food Products Are Beneficial for Health. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 1171–1185. [[CrossRef](#)]
27. Lee, D.E.; Huh, C.S.; Ra, J.; Choi, I.D.; Jeong, J.W.; Kim, S.H.; Ryu, J.H.; Seo, Y.K.; Koh, J.S.; Lee, J.H.; et al. Clinical Evidence of Effects of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on Skin Aging: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 2160–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Mohammedsaeed, W.; Cruickshank, S.; McBain, A.J.; O'Neill, C.A. *Lactobacillus rhamnosus* GG Lysate Increases Re-Epithelialization of Keratinocyte Scratch Assays by Promoting Migration. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16147. [CrossRef]
29. Guéniche, A.; Bastien, P.; Ovigne, J.M.; Kermici, M.; Courchay, G.; Chevalier, V.; Breton, L.; Castiel-Higounenc, I. Bifidobacterium Longum Lysate, a New Ingredient for Reactive Skin. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, e1–e8. [CrossRef]
30. Vinderola, G.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 5th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019.
31. Rizzardini, G.; Eskesen, D.; Calder, P.C.; Capetti, A.; Jespersen, L.; Clerici, M. Evaluation of the Immune Benefits of Two Probiotic Strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12[®] and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. casei* 431[®] in an Influenza Vaccination Model: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 876–884. [CrossRef]
32. Saarela, M.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Mättö, J.; Mattila-Sandholm, T. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. *J. Biotechnol.* **2000**, *84*, 197–215. [CrossRef]
33. Sanders, M.E.; Akkermans, L.M.A.; Haller, D.; Hammerman, C.; Heimbach, J.; Hörmannspurger, G.; Huys, G. Safety Assessment of Probiotics for Human Use. *Gut Microbes* **2010**, *1*, 164–185. [CrossRef]
34. Arenales-Sierra, I.M.; Lobato-Calleros, C.; Vernon-Carter, E.J.; Hernández-Rodríguez, L.; Alvarez-Ramirez, J. Calcium Alginate Beads Loaded with Mg(OH)₂ Improve *L. casei* Viability under Simulated Gastric Condition. *LWT* **2019**, *112*, 108220. [CrossRef]
35. Łętocha, A.; Miałkowska, M.; Sikora, E. Sposób Otrzymywania Mikrokapsulek Zawierających Bakterie Probiotyczne. Patent 443812, 16 February 2023.
36. Lasta, E.L.; da Silva Pereira Ronning, E.; Dekker, R.F.H.; da Cunha, M.A.A. Encapsulation and Dispersion of *Lactobacillus acidophilus* in a Chocolate Coating as a Strategy for Maintaining Cell Viability in Cereal Bars. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20550. [CrossRef] [PubMed]
37. The European Parliament and the Council of the European Union Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. 2009, p. 342/59. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32009R1223> (accessed on 28 December 2023).
38. Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miałkowska, M.; Sikora, E. Formuła Kosmetyczna Lub Dermokosmetyczna Zawierająca Bakterie Probiotyczne. Patent 445990, 1 September 2023.
39. Sikora, E. *Cosmetic Emulsions*; Wydawnictwo PK: Kraków, Poland, 2019.
40. Sikora, E.; Miałkowska, M.; Lasoń, E. *Selected Skin Delivery Systems*; Wydawnictwo PK: Kraków, Poland, 2020.
41. Haghshenas, B.; Abdullah, N.; Nami, Y.; Radiah, D.; Rosli, R.; Khosroushahi, A.Y. Microencapsulation of Probiotic Bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN Using Alginate-Psyllium-Fenugreek Polymeric Blends. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 1048–1057. [CrossRef] [PubMed]
42. Angélica Garrido-Pereira, M.; Braga, A.L.; Da Rocha, A.F.; Sampaio, L.A.; Abreu, P.C. Effect of Ultraviolet (UV) Radiation on the Abundance and Respiration Rates of Probiotic Bacteria. *Aquac. Res.* **2013**, *44*, 261–267. [CrossRef]
43. Miałkowska, M.; Kulawik-Pióro, A.; Lasoń, E.; Śliwa, K.; Malinowska, M.A.; Sikora, E.; Kantyka, T.; Bielecka, E.; Maksylewicz, A.; Klimaszewska, E.; et al. Topical Formulations Based on Ursolic Acid-Loaded Nanoemulgel with Potential Application in Psoriasis Treatment. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2559. [CrossRef]
44. Morgan, C.A.; Herman, N.; White, P.A.; Vesey, G. Preservation of Micro-Organisms by Drying; A Review. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 183–193. [CrossRef]
45. Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R.P. Anhydrobiotics: The Challenges of Drying Probiotic Cultures. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1406–1416. [CrossRef]
46. Anal, A.K.; Singh, H. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 240–251. [CrossRef]
47. Sohail, A.; Turner, M.S.; Coombes, A.; Bhandari, B. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 2763–2769. [CrossRef]
48. Oberoi, K.; Tolun, A.; Altintas, Z.; Sharma, S. Effect of Alginate-Microencapsulated Hydrogels on the Survival of *Lactobacillus rhamnosus* under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Foods* **2021**, *10*, 1999. [CrossRef]
49. Ouled-Haddar, H.; Sifour, M.; Idoui, T.; Bouridane, H.; Arid, S. *Lactobacillus plantarum* G1 Microencapsulation Enhanced Its Viability during Storage and Gastrointestinal Transit. *Sains Malays.* **2016**, *45*, 1049–1055.
50. Abbaszadeh, S.; Gandomi, H.; Misaghi, A.; Bokaei, S.; Noori, N. The Effect of Alginate and Chitosan Concentrations on Some Properties of Chitosan-Coated Alginate Beads and Survivability of Encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in Simulated Gastrointestinal Conditions and during Heat Processing. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 2210–2216. [CrossRef] [PubMed]
51. Butorac, K.; Novak, J.; Bellich, B.; Terán, L.C.; Banić, M.; Leboš Pavunc, A.; Zjalić, S.; Cescutti, P.; Šušković, J.; Kos, B. Lyophilized Alginate-Based Microspheres Containing *Lactobacillus fermentum* D12, an Exopolysaccharides Producer, Contribute to the Strain's Functionality In Vitro. *Microb. Cell Fact* **2021**, *20*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
52. Kim, S.J.; Cho, S.Y.; Kim, S.H.; Song, O.J.; Shin, I.S.; Cha, D.S.; Park, H.J. Effect of Microencapsulation on Viability and Other Characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT* **2008**, *41*, 493–500. [CrossRef]
53. Li, P.; Müller, M.; Chang, M.W.; Frettlöh, M.; Schönherr, H. Encapsulation of Autoinducer Sensing Reporter Bacteria in Reinforced Alginate-Based Microbeads. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 22321–22331. [CrossRef]

54. Khorramvatan, S.; Marzban, R.; Ardjmand, M.; Safekordi, A.; Askary, H. The Effect of Polymers on the Stability of Microencapsulated Formulations of *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* (Bt-KD2) after Exposure to Ultra Violet Radiation. *Biocontrol Sci. Technol.* **2014**, *24*, 462–472. [\[CrossRef\]](#)
55. Geis, P.A. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*; Geis, P.A., Ed.; Taylor & Francis: New York, NY, USA, 2006; pp. 163–180. [\[CrossRef\]](#)
56. Halla, N.; Fernandes, I.P.; Heleno, S.A.; Costa, P.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Rodrigues, A.E.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreiro, M.F. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules* **2018**, *23*, 1571. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Alvarez-Rivera, G.; Llompарт, M.; Lores, M.; Garcia-Jares, C. Chapter 9-Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In *Analysis of Cosmetic Products*, 2nd ed.; Salvador, A., Chisvert, A., Eds.; Elsevier B.V.: New York, NY, USA, 2018; pp. 175–224. [\[CrossRef\]](#)
58. Dwivedi, S.; Prajapati, P.; Vyas, N.; Malviya, S.; Kharia, A. A Review on Food Preservation: Methods, Harmful Effects and Better Alternatives. *Asian J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *3*, 193–199.
59. Maurício, E.; Rosado, C.; Duarte, M.P.; Verissimo, J.; Bom, S.; Vasconcelos, L. Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products. *Cosmetics* **2017**, *4*, 41. [\[CrossRef\]](#)
60. Hughes, O.B.; Maderal, A.D.; Tosti, A. Preservative Sensitization—Safety With and Safety Without. *Curr. Treat. Options Allergy* **2016**, *3*, 345–358. [\[CrossRef\]](#)
61. Martins, A.M.; Marto, J.M. A Sustainable Life Cycle for Cosmetics: From Design and Development to Post-Use Phase. *Sustain. Chem. Pharm.* **2023**, *35*, 101178. [\[CrossRef\]](#)
62. Ricke, S.C. Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. *Poult. Sci.* **2003**, *82*, 632–639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Stratford, M.; Eklund, T. Organic Acids and Esters. In *Food Preservatives*; Russell, N.J., Gould, G.W., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2003; pp. 48–84.
64. Haft, R.J.F.; Keating, D.H.; Schwaegler, T.; Schwalbach, M.S.; Vinokur, J.; Tremaine, M.; Peters, J.M.; Kotlajich, M.V.; Pohlmann, E.L.; Ong, I.M.; et al. Correcting Direct Effects of Ethanol on Translation and Transcription Machinery Confers Ethanol Tolerance in Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E2576–E2585. [\[CrossRef\]](#)
65. Santos, P.M.; Benndorf, D.; Sá-Correia, I. Insights into *Pseudomonas Putida* KT2440 Response to Phenol-Induced Stress by Quantitative Proteomics. *Proteomics* **2004**, *4*, 2640–2652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Lucchini, J.J.; Corre, J.; Cremieux, A. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds and Aromatic Alcohols. *Res. Microbiol.* **1990**, *141*, 499–510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Lambert, P.A. Mechanisms of Action of Microbicides. In *Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 5th ed.; Fraise, A., Maillard, J.Y., Sattar, S., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 95–107.
68. Morente, E.O.; Fernández-Fuentes, M.A.; Burgos, M.J.G.; Abriouel, H.; Pulido, R.P.; Gálvez, A. Biocide Tolerance in Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 13–25. [\[CrossRef\]](#)
69. Chen, N.H.; Djoko, K.Y.; Veyrier, F.J.; McEwan, A.G. Formaldehyde Stress Responses in Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 257. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics

Anna Łętocha ^{1,*}, Małgorzata Miastkowska ¹, Elżbieta Sikora ¹, Alicja Michalczyk ²,
Marta Liszka-Skoczylas ³ and Mariusz Witczak ³

¹ Cracow University of Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, 31-155 Cracow, Poland; malgorzata.miastkowska@pk.edu.pl (M.M.); elzbieta.sikora@pk.edu.pl (E.S.)

² Lukasiewicz—Research Network-Institute of Industrial Organic Chemistry, 03-236 Warsaw, Poland; alicja.michalczyk@ipo.lukasiewicz.gov.pl

³ Department of Engineering and Machinery for Food Industry, University of Agriculture in Krakow, Balicka Street 122, 30-149 Cracow, Poland; marta.liszka-skoczylas@urk.edu.pl (M.L.-S.); mariusz.witczak@urk.edu.pl (M.W.)

* Correspondence: anna.letocha@pk.edu.pl



Citation: Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E.; Michalczyk, A.; Liszka-Skoczylas, M.; Witczak, M. Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics. *Molecules* **2024**, *29*, 5984. <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

Academic Editors: Jianxun Ding, Katarzyna Gawel-Beben and Anna Nowak

Received: 31 October 2024

Revised: 4 December 2024

Accepted: 13 December 2024

Published: 19 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oleogels (organogels) are systems resembling a solid substance based on the gelation of organic solvents (oil or non-polar liquid) through components of low molecular weight or oil-soluble polymers. Such compounds are organogelators that produce a thermoreversible three-dimensional gel network that captures liquid organic solvents. Oleogels based on natural oils are attracting more attention due to their numerous advantages, such as their unsaturated fatty acid contents, ease of preparation, and safety of use. As a result of the research, two oleogels were developed, into which freeze-dried alginate carriers with a probiotic, *L. casei*, were incorporated. Two techniques were used to produce probiotic-loaded capsules—extrusion and emulsification. Alginate beads obtained by the extrusion process have a size of approximately 1.2 mm, while much smaller microspheres were obtained using the emulsification technique, ranging in size from 8 to 17 µm. The trehalose was added as a cryoprotectant to improve the survival rate of probiotics in freeze-dried alginate carriers. The encapsulation efficiency for both of the methods applied, the emulsification and the extrusion technique, was high, with levels of 90% and 87%, respectively. The obtained results showed that the production method of probiotic-loaded microspheres influence the bacterial viability. The better strain survival in the developed systems was achieved in the case of microspheres produced by the emulsification (reduction in bacterial cell viability in the range of 1.98–3.97 log in silica oleogel and 2.15–3.81 log in sucragel oleogel after 7 and 30 days of storage) than by the extrusion technique (after a week and a month of oleogel storage, the decrease in cell viability was 2.52–4.52 log in silica oleogel and 2.48–4.44 log in sucragel oleogel).

Keywords: oleogels; probiotics; alginate microspheres; beads; carriers; hybrid systems; *L. casei*

1. Introduction

The advantage of oils applied onto the skin is their epidermis-softening properties. They also influence skin hydration and elasticity. In the case of vegetable oils, in addition to their moisturising effect, the skin protective action should be emphasised [1]. Natural oils are characterised by good penetration through the skin; they are incorporated into the lipids of the *stratum corneum* and thus contribute to the improvement of the skin barrier function. The disadvantage of natural oils is their low chemical stability under the influence of light and oxygen. Oils are relatively rarely used as independent carriers of dermatological medicines. Due to their semi-solid consistency, ointments are more convenient to apply [2,3]. A form of medicine or cosmetic formulation that can combine the advantages of ointments and oils are lipophilic gels [1]. Gels are a popular form, in areas such as pharmacy, medicine, the cosmetics industry, tissue engineering, food production,

optics, telecommunications, electronics, and polymer plastics processing. There are two main types of gels, hydrogels and organogels, which are distinguished due to the type of liquid phase constituting them [4]. Hydrogels are mainly composed of a hydrophilic polymer network that can absorb large amounts of polar liquid. Oleogels (organogels) are created by stabilising oil in a network created by a gelling medium with a viscous and elastic consistency [5–7] (Figure 1). As a result of the heating and cooling of the mixture, interactions occur between the liquid and solid phases [8]. Oil molecules are trapped in a three-dimensional network, which does not cause changes in their chemical composition, and the resulting structure has gel properties [9]. Some types of gels are designed to combine some of the features of hydrogels and oleogels. These hybrid gels, or bigels, are systems that generally contain two immiscible liquid phases that are individually stabilised by independent gelators (Figure 1) [10,11]. Bigels exhibit the advantages of both oil and water phases, including the ability to simultaneously deliver lipophilic and hydrophilic actives and improved viscoelasticity [10,12]. Other hybrid systems are emulgels (a type of hybrid between emulsions and gels) (Figure 1). Emulgels are formed by an emulsification process followed by a gelation process which involves the cross-linking and/or gelation of the compounds present in the mixture.

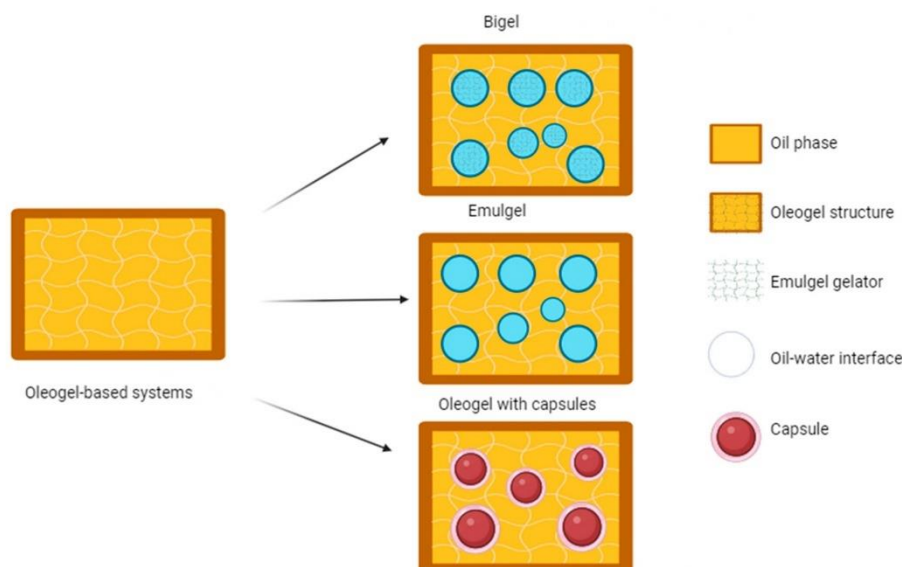


Figure 1. Scheme of oleogel-based systems [by author].

Two main criteria are used to classify oleogels in the literature. The first is the amount of oleogelator used to obtain the product. As a result, single-component and multi-component (i.e., mixed) organogels are obtained. The second criterion is the type of oleogelator used. As a result, oleogels are formed from low-molecular-weight oleogelators and high-molecular-weight oleogelators [13–16]. Gelling substances of low molecular weight include, inter alia, edible and vegetable oils compatible with the skin (e.g., olive oil, sweet almond oil) [15–17], organic solvents (e.g., benzene, hexane) [18], waxes (beeswax, carnauba wax, candelilla wax) [19,20], colloidal silica [21,22], lecithin [11,23], fatty acids and alcohols, fatty acid esters and/or their mixtures [24,25], ceramides [26], phytosterols [27], and surfactants [11,23]. In turn, high molecular weight oleogelators include polysaccharides (e.g., ethylcellulose), proteins, and others polymers [11,28–30].

Organogels can be the carriers for encapsulated probiotics as they provide additional protection against unfavourable conditions and reduce the loss of bacterial cells in the hydrocolloid matrix (Figure 1). Probiotics are live microorganisms with biological and physiological effects on the microbiome population, which have the potential to prevent and treat various pathologies, including regulating the microflora by inhibiting pathogenic microorganisms, producing anticancer compounds [31,32] and modulating the immune response [33]. Moreover, the use of a hybrid system and prior encapsulation of probiotics in an additional carrier can enable the increased viability and therapeutic effect of the formulation [34,35] (Figure 2) because in the case of such a hybrid system, there is no need to use a preservative system. The selection of an appropriate shell material is crucial for the stability of the obtained particles. This carrier may be alginate microspheres, which are biocompatible, biodegradable, and non-toxic delivery systems for active substances [36,37].

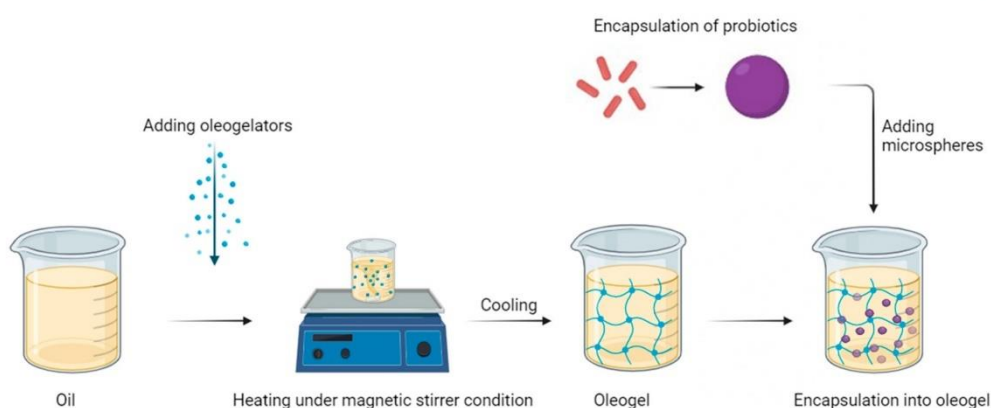


Figure 2. Schematic description of the incorporation of encapsulated probiotics into the oleogel system [by author].

Thus far, no studies have focused on the application of the oleogel systems as carriers of probiotics encapsulated in hydropolymer capsules. Therefore, the main aim of the work was to find out whether oleogel conditions influenced the survival of bacteria in alginate capsules. For this purpose, stable forms of oleogels were developed to which alginate carriers containing probiotics were incorporated. Trehalose was used as a cryoprotective agent protecting bacterial cells from lyophilisation.

2. Results and Discussion

2.1. Size and Viability of Bacteria and Encapsulation Efficiency in Microcapsules

Five different types of probiotic-loaded microspheres were developed using two methods, emulsification and extrusion, and trehalose (Thl) was used as a cryoprotectant (Table 1). In addition, two emulsifiers were used to obtain microspheres using the emulsification technique ECO-Tween 80 (Alg/T80) and Span 80 (Alg/S80).

Table 1. Size and EE of the capsules obtained using the emulsification and extrusion techniques.

Technique	Type of Capsule	Size [μm]	Cell Viability [$\log \text{CFU g}^{-1}$]	EE [%]
Emulsification	Alg/T80	16.8 ± 3.02	9.61	89
	Alg/S80	8.03 ± 2.12	5.4	50
	Alg/T80/Thl	15.9 ± 4.18	9.72	90
Extrusion	Alg	1216 ± 302.86	9.1	84
	Alg/Thl	1169 ± 412.11	9.4	87

The method used to obtain the probiotic microcapsules influenced their properties. Beads obtained using the extrusion technique have sizes of around 1.2 mm. However, as a result of emulsification, much smaller microspheres were obtained, with sizes ranging from 8 to 17 μm . The obtained results are consistent with the results of other research groups [38–41], where the use of the extrusion technique resulted in obtaining balls with sizes in the range of millimetres, while emulsification allows obtaining micrometre particles. In the study by Nualkaekul et al. [40] regarding the encapsulation of *L. plantarum* in alginate beads using the extrusion method, capsules with sizes ranging from 2.9 to 3.1 mm were obtained. In the case of the study by Muthukumarasamy et al. [39] regarding the microencapsulation of *L. reuteri* using the extrusion and emulsification methods, the sizes of the beads obtained by extrusion ranged from 2 to 4 mm, while for emulsification, they ranged from 38 to 323 μm . In the study by Mokarram et al. [41], microspheres with probiotics (*L. acidophilus* and *L. rhamnosus*) were obtained using the emulsification technique with sizes of 23.758–75.339 μm .

In the case of cell viability and encapsulation efficiency, the methodology for obtaining the microcapsules did not significantly influence the results. With both emulsification and extrusion (carriers with Tween 80 as an emulsifier in the first technique or with the addition of trehalose), the obtained results were at a similar level and ranged from 9.72 log CFU/g to 9.1 log CFU/g and 90 to 84%, respectively. In the emulsification technique, the use of Span 80 as an emulsifier to produce the W/O pre-emulsion resulted in significantly lower encapsulation efficiency (50%) and a survival rate of *L. casei* of 5.4 log CFU/g. This may be due to the fact that the microspheres obtained in this way had very small sizes of $8.03 \mu\text{m} \pm 2.12 \mu\text{m}$, and the sizes of the probiotic bacteria themselves ranged from 1 to 4 μm [36,42]. As a result of obtaining such small sizes of microspheres, ineffective encapsulation of the probiotic strain inside the capsule may have occurred, resulting in low encapsulation efficiency.

2.2. Survival of Microencapsulated Probiotics During the Freeze-Drying Process

At this stage of the study, the effect of carriers on probiotic survival was analysed. The tests were performed for the capsules obtained by both the emulsification and extrusion techniques and compared to free bacteria not subjected to the encapsulation process.

After the freeze-drying process, the survival rate of encapsulated probiotics was significantly higher than that of free cells (Figure 3).

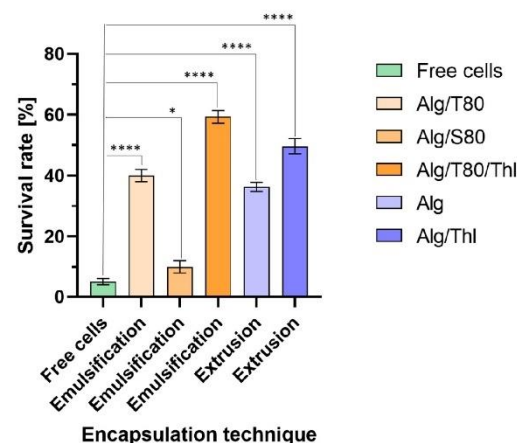


Figure 3. Survival rate of free cells and encapsulated probiotics in the emulsification and extrusion techniques. The bars represent standard deviations of the means according to three independent repeated experiments. *— $p = 0.05$ – 0.011 ; ****— $p \leq 0.0001$.

The lowest survival value of probiotic bacteria was found in the case of freeze-dried Alg/S80 microspheres obtained by emulsification, which is also influenced by the already low initial efficiency of encapsulation—this level was 10% and was similar to the survival rate of freeze-dried, non-encapsulated bacteria (6%). A slightly higher survival rate was observed in the case of Alg/T80 microspheres obtained by emulsification (40%) and Alg capsules obtained by extrusion (35%). In freeze-dried Alg/T80/Thl microspheres obtained by emulsification and Alg/Thl capsules obtained by extrusion, the highest survival rates of the *L. casei* strain were achieved, which were 60% and 50%, respectively.

Reducing the rate of water diffusion from cells leads to the formation of intracellular ice crystals in the freezing phase, which ultimately damages the cell membrane and leads to cell death [43]. However, cells gradually become dehydrated because ice slowly forms outside the cell, which in turn leads to extensive cell damage [44]. The higher survival due to encapsulation is explained by the possible protection of cells against osmotic shock caused by delayed hydration due to the presence of the capsule microenvironment [45,46]. After adding trehalose to the alginate solution as a cryoprotectant, the survival rate of probiotics in microcapsules significantly increased to 20% using the emulsification technique, and 15% in the case of extrusion. As a result of the addition of the cryoprotectant, a strong ion–dipole interaction may occur and hydrogen bonds may be formed between trehalose and cell biomolecules [47,48], which results in the improved survival of the probiotics during freezing and less cell loss in the freezing process.

2.3. SEM Analysis

The surface morphology of the alginate carriers obtained through the emulsification (Figure 4) and extrusion technique were analysed using scanning electron microscopy (SEM) (Figure 5).

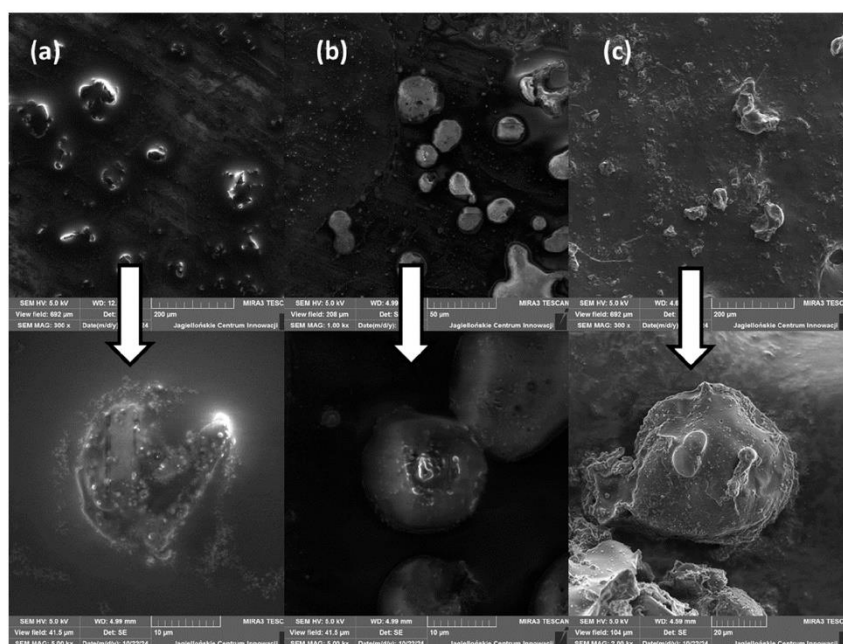


Figure 4. SEM micrographs of freeze-dried microspheres obtained by emulsification: (a) alginate–Tween 80 microspheres, (b) alginate–Span 80 microspheres, and (c) alginate–Tween 80–trehalose microspheres.

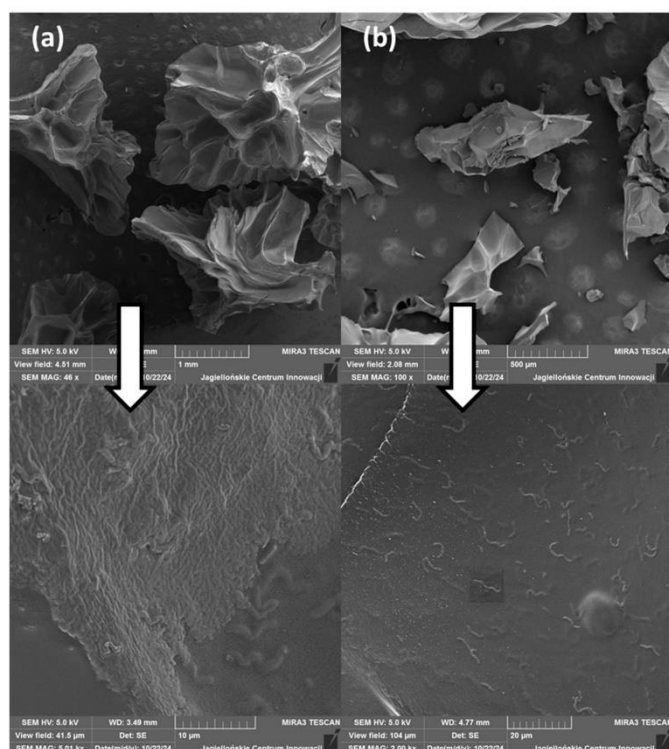


Figure 5. SEM micrographs and cross sections of freeze-dried beads obtained by extrusion: (a) alginate beads and (b) alginate–trehalose beads.

The SEM analysis shows that the methods of the probiotic-loaded capsules influence the size and shape of the carriers. SEM images confirm that the particles obtained through the extrusion technique showed significantly larger sizes than the microspheres obtained using the emulsification technique, which is consistent with the literature [38]. Additionally, in the case of the emulsification method, the kind of emulsifier used affects the size of the microspheres. The smallest microspheres were obtained when Span 80 was used as the emulsifying agent, but scanning microscope images showed the lowest visibility of the encapsulated probiotics compared to the larger microspheres obtained when Tween 80 was used.

The use of trehalose as a cryoprotectant, irrespective of the method used, did not affect the size of the obtained particles but influenced their shapes. With the addition of trehalose, more spherical capsules were obtained. Moreover, for the cross section through the beads for the extrusion technique, it can be seen that the addition of trehalose affects the smoothing of the particle structure after lyophilisation. This is consistent with the literature sources, which report that as a result of lyophilisation, the capsules are dehydrated, which can lead to damage of the carrier structures and a change in the shape of the obtained particles [43,44].

2.4. Survival of Freeze-Dried Microcapsules in Oleogels

In the next stage of the study concerning probiotic-loaded hybrid systems (freeze-dried capsules incorporated into previously prepared oleogels), the viability of the bacteria was checked.

The initial density of the *L. casei* strain contained in the freeze-dried capsules and incorporated into oleogels was 5.8 log CFU/g. For the emulsification technique, Tween 80 was used as the emulsifier due to its better encapsulation efficiency. A cryoprotectant, trehalose, was also added to the carrier formulation (alginate solution), which had a positive effect on the bacteria survival rate as a result of the freeze-drying process. Table 2 presents the results of the survival of the probiotic *L. casei* in two oleogel systems.

Table 2. Viability of encapsulated probiotic bacteria in oleogels.

Oleogel Type	Encapsulation Technique	Type of Microcapsules	Immediately		After 7 Days		After 30 Days	
			Cell Viability [log CFU g ⁻¹]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU g ⁻¹]	Log Reduction	Cell Viability [log CFU g ⁻¹]	Log Reduction
OG-K	Emulsification	Alg/T80/Thl	5.54	0.26	3.82	1.98	1.83	3.97
	Extrusion	Alg/Thl	5.48	0.32	3.28	2.52	1.28	4.52
OG-S	Emulsification	Alg/T80/Thl	5.52	0.28	3.65	2.15	1.99	3.81
	Extrusion	Alg/Thl	5.44	0.36	3.32	2.48	1.36	4.44

The bacteria survival rate was assessed immediately after the production of the oleogels, as well as after 7 and 30 days of storage. In the case of oleogels (OG-K and OG-S) containing microspheres with the *L. casei* strain obtained by emulsification, a decrease in the number of probiotic cells by 0.26 log and 0.28 log, respectively, was observed immediately after preparation of the formulation. In studies performed at intervals of 7 and 30 days of organogel storage, a reduction in the viability of bacterial cells was observed in the range of 1.98 to 3.97 log (OG-K) and from 2.15 to 3.81 log (OG-S) compared to the initial value. However, in the case of oleogels containing capsules produced by extrusion, directly after preparing the formulations, the number of *L. casei* cells decreased by 0.32 log (OG-K) and 0.36 log (OG-S). After a week and a month of oleogel storage, the decrease in cell viability was from 2.52 to 4.52 log (OG-K) and from 2.48 to 4.44 log (OG-S).

The literature has so far shown that oleogels can be a carrier for many nutraceuticals while research efforts on the entrapment of probiotics in oleogels are very scarce. Zhuang et al. [49] examined the ability of an oleogel emulsion based on soy lecithin to increase the viability of probiotics. The findings showed that oxidation was significantly slowed down in the soy lecithin-based oleogel emulsion. However, it was not the physical barrier of the oleogel emulsion but the presence of lecithin that increased the viability of probiotics. So far, no positive effect of oleogels on the protection and delivery of probiotics has been demonstrated. Therefore, our study focused on introducing not only probiotics into the formulation but also freeze-dried microcapsules containing probiotics. Based on the studies on the viability of freeze-dried probiotic capsules in oleogels, better strain survival was achieved for microcapsules produced by emulsification (1.83 log in OG-K and 1.99 log in OG-S after 30 days of storage). However, in the case of further research, it would be necessary to focus on increasing the number of cells in the initial freeze-dried microspheres introduced into the product so that their final viability over time would be higher.

2.5. Physicochemical Properties of Prepared Oleogels

The physicochemical, microbiological, and rheological studies were performed for oleogels containing optimal microspheres, which had the highest encapsulation efficiency and the best bacteria viability over time (Alg/T80/Thl microspheres).

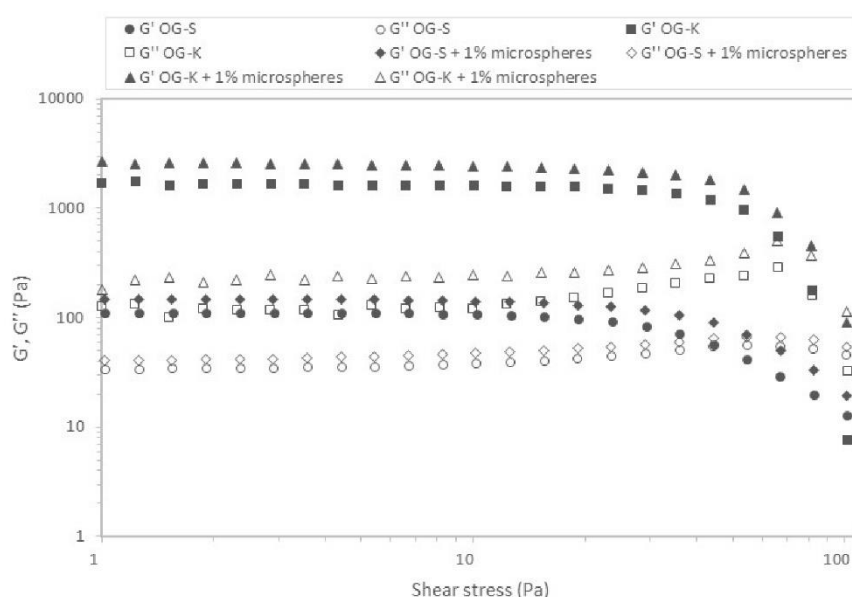
Two types of stable formulations were prepared. Samples were submitted to an accelerated stability study by centrifugation and to a thermal stability test in order to confirm that the texture of the oleogels had not been altered. The obtained formulations were characterised by pH corresponding to the physiological skin pH. Table 3 describes the physicochemical properties of the prepared oleogels (base formulations and formulations with microspheres).

Table 3. Physicochemical properties of oleogels.

	OG-K	OG-K + 1% Microspheres	OG-S	OG-S + 1% Microspheres
Centrifugation test	+	+	+	+
Thermal stability test	+	+	+	+
pH	6.04 (± 0.02)	5.92 (± 0.03)	6.08 (± 0.03)	5.90 (± 0.02)

The results of the mikrocount combi test confirmed the microbiological stability of the formulations. After the incubation time, the results were compared with the evaluation table, which indicates the degree of microbial contamination of the samples [50]. No growth of bacteria, moulds or yeasts was observed.

In the next stage of the research, the viscoelastic properties of the prepared formulations were checked. Figures 6 and 7 show the relation of moduli on stress for the analysed samples.

**Figure 6.** Examples of stress sweeps for the studied oleogels. G' : storage modulus (filled symbols); G'' : loss modulus (empty symbols)—temperature 20 °C.

In all cases, the G' values were higher than G'' , which indicates the predominance of elastic properties over viscous properties. Tables 4 and 5 list the critical stress values defining the range of linear viscoelasticity and the corresponding stresses.

The stress values ranged from 10.55 to 35.20 Pa depending on the sample and measurement temperature. Higher values were obtained for samples produced using Aerosil 200 (OG-K), and lower for samples acquired using Sucragel AOF (OG-S). In most cases, the addition of microcapsules caused a decrease in the stress value defining the upper limit of the linear viscoelasticity range; the exception was the sample based on Aerosil 200, for which an increase in this value was found at a higher measurement temperature (37 °C). It should also be emphasised that the OG-K samples (with and without microcapsules) behaved differently, for which an increase in the critical stress value was found with an increase in temperature, while for samples based on Sucragel, a decrease in these values was found. The extension of the linear viscoelasticity range with an increase in temperature can

be attributed to the improvement in the stability of the samples with the addition of Aerosil 200 during heating by generating stronger bonds and denser particle packing [21,51]. This is confirmed by the relationships obtained for the mechanical spectra (Figures 8 and 9, Tables 4 and 5).

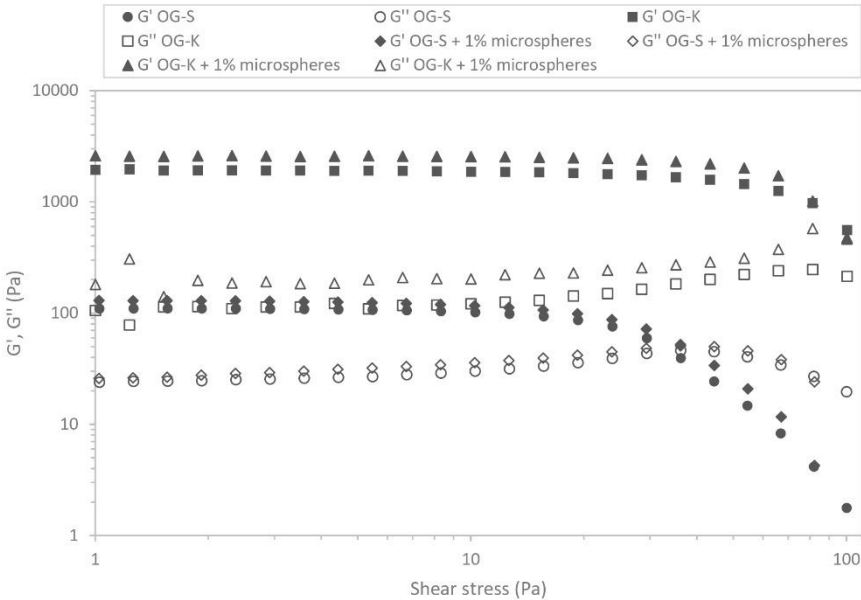


Figure 7. Example stress sweeps for the studied oleogels. G' : storage modulus (filled symbols); G'' : loss modulus (empty symbols)—temperature 37 °C.

Table 4. Mean values of oscillatory tests parameters in oleogels. Amplitude sweeps: end of linear viscoelastic region, LVR (τ and γ). Frequency sweeps: power law parameter fits (G_1' , G_1'' , m' , and m'') and loss tangent at 1 rad/s—temperature 20 °C.

Oleogel	LVR		Frequency Sweeps				
	τ (Pa)	γ	G_1' (Pa)	m'	G_1'' (Pa)	m''	$\tan \delta$ (1 rad/s)
OG-S	17.73 ± 1.16 ^a	0.168 ± 0.010 ^d	131.7 ± 4.4 ^a	0.209 ± 0.003 ^c	47.8 ± 0.7 ^b	0.386 ± 0.009 ^c	0.271 ± 0.009 ^d
OG-K	27.54 ± 1.52 ^b	0.020 ± 0.002 ^b	376.7 ± 19.1 ^b	0.052 ± 0.000 ^b	40.1 ± 1.4 ^a	0.390 ± 0.010 ^c	0.059 ± 0.001 ^b
OG-S + 1% microspheres	16.95 ± 0.71 ^a	0.120 ± 0.003 ^c	879.1 ± 40.3 ^c	0.048 ± 0.002 ^b	85.4 ± 3.4 ^d	0.213 ± 0.005 ^a	0.067 ± 0.001 ^c
OG-K + 1% microspheres	25.63 ± 0.44 ^b	0.012 ± 0.000 ^a	886.2 ± 23.6 ^c	0.042 ± 0.002 ^a	74.1 ± 1.5 ^c	0.265 ± 0.004 ^b	0.054 ± 0.000 ^a

OG-S: oleogels with sucragel; OG-K: oleogels with silica. Different letters in each column indicate significance between the means (<0.05) according to Tukey’s test.

Table 5. Mean values of oscillatory tests parameters in oleogels. Amplitude sweeps: end of linear viscoelastic region, LVR (τ and γ). Frequency sweeps: power law parameter fits (G_1' , G_1'' , m' , and m'') and loss tangent at 1 rad/s—temperature 37 °C.

Oleogel	LVR		Frequency Sweeps				
	τ (Pa)	γ	G_1' (Pa)	m'	G_1'' (Pa)	m''	$\tan \delta$ (1 rad/s)
OG-S	12.57 ± 0.56 ^a	0.124 ± 0.003 ^d	113.8 ± 4.6 ^a	0.149 ± 0.006 ^b	31.6 ± 1.3 ^a	0.421 ± 0.007 ^d	0.172 ± 0.002 ^b
OG-K	30.93 ± 0.37 ^b	0.021 ± 0.002 ^b	461.5 ± 20.8 ^b	0.042 ± 0.002 ^a	36.2 ± 1.7 ^a	0.313 ± 0.005 ^c	0.046 ± 0.001 ^a
OG-S + 1% microspheres	10.55 ± 0.40 ^a	0.082 ± 0.003 ^c	796.7 ± 32.8 ^c	0.040 ± 0.002 ^a	60.5 ± 2.5 ^b	0.179 ± 0.014 ^a	0.053 ± 0.004 ^a
OG-K + 1% microspheres	35.20 ± 0.69 ^c	0.014 ± 0.001 ^a	952.3 ± 76.8 ^d	0.036 ± 0.001 ^a	68.7 ± 7.2 ^b	0.218 ± 0.018 ^b	0.049 ± 0.005 ^a

OG-S: oleogels with sucragel; OG-K: oleogels with silica. Different letters in each column indicate significance between the means (<0.05) according to Tukey’s test.

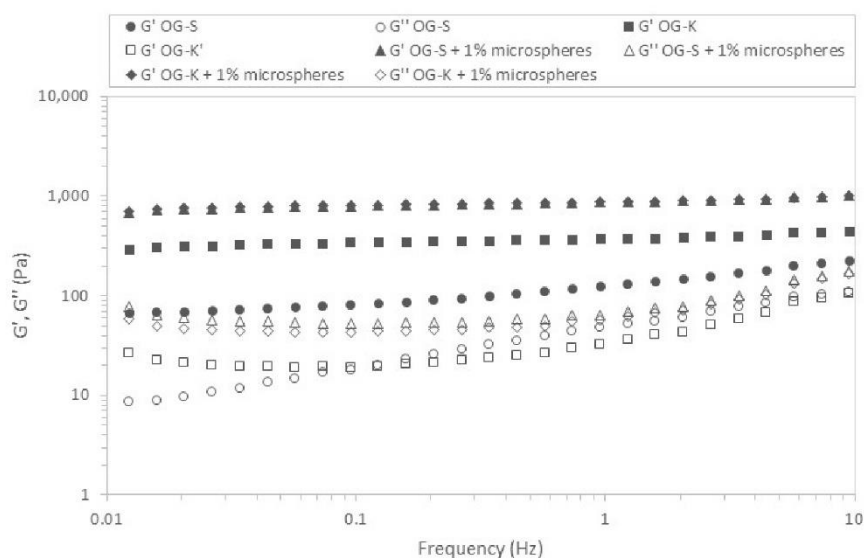


Figure 8. Frequency sweeps for the different oleogels studied. G' : storage modulus (filled symbols); G'' : loss modulus (empty symbols)—temperature 20 °C.

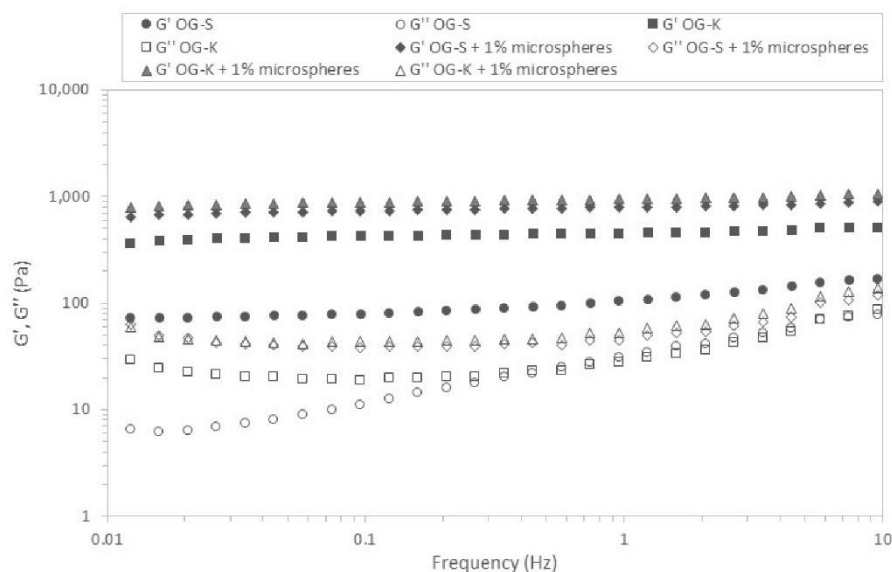


Figure 9. Frequency sweeps for the different oleogels studied. G' : storage modulus (filled symbols); G'' : loss modulus (empty symbols)—temperature 37 °C.

The lowest modulus values were obtained for the OG-S base sample, which was also characterised by the highest $\tan \delta$ value, which indicates a relatively high share of viscous properties. In all analysed cases, the modulus values increased with increasing frequency and the elastic modulus dominated over the loss modulus, which indicates the dominance

of elastic over viscous properties. With the exception of the OG-S sample without microcapsules, the remaining samples met the definition of a strong gel ($G''/G' < 0.1$) [52]. The addition of microcapsules caused an increase in the modulus values and a decrease in the phase shift angle value in both cases, which indicates an increase in the share of elastic properties and improved stability of the tested samples. In most cases, an increase in temperature caused a decrease in the modulus values and a decrease in the share of viscous properties (decrease in the $\tan \delta$ value) for samples with the addition of Sucragel AOF. An increase in the storage modulus value with increasing temperature was found for samples produced using Aerosil 200 (in both cases). This rather unusual behaviour of silica samples, as mentioned above, may be related to the sample preparation methodology or lack of treatment at higher temperature, which may lead to significant structural changes during heating, resulting in an increase in the range in which the sample behaves in a stable manner (constant or slight increase in modulus values as a function of stress and extension of the range of linear viscoelasticity). A similar relationship was found in the work of Patel et al. [21], where an increase in gel strength determined by an increase in the G' modulus value was found after heating. The cited authors observed irreversible restructuring and an increase in the strength of the hydrophilic silica particle network in nonpolar solvents under the influence of heating, which was explained using a fractal gel model. According to the cited work and the work of Wu et al. [51], this is related to the increase in the fractal dimension at higher temperatures as a result of more compact packing and thus stronger hydrogen bonds due to the proximity of the packed particles.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Alginic acid sodium salt from brown algae, MRS broth and MRS agar (de Man Rogosa Sharpe), and sodium citrate were bought from Sigma Aldrich (Poznań, Poland). The *Lactobacillus casei* strain ATCC 393 was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). ECO-Tween 80 (INCI: Polysorbate 80), Span 80, and Crodamol GTCC (INCI: Caprylic/Capric Triglyceride) were kindly supplied by Croda (Krakow, Poland). Sweet almond oil (INCI: *Prunus Amygdalus Dulcis* (Sweet Almond) Oil) was bought from Ecospa (Warsaw, Poland), Aerosil 200 (INCI: Silica) was obtained from Evonik Industries AG (Essen, Germany), and Sucragel AOF (INCI: Glycerin, Aqua, Sucrose Laurate) was purchased from Alfa-chemicals (Binfield, UK).

3.2. Preparation and Cultivation of Bacteria

The freeze-dried culture of *Lactobacillus casei* strain ATCC 393 was transferred into MRS broth and incubated for 48 h at 30 °C under aerobic conditions. Harvesting of cells in the log phase was performed by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The cells were washed twice using a 0.9% (w/v) sterile saline solution. The cell pellets were resuspended in the saline solution and prepared at a final concentration of $10.8 \log \text{CFU/g}$. The numbers of bacteria cells in the suspension were determined by counting them on plates in an MRS agar medium (37 °C, 72 h), using the pour plate inoculation technique.

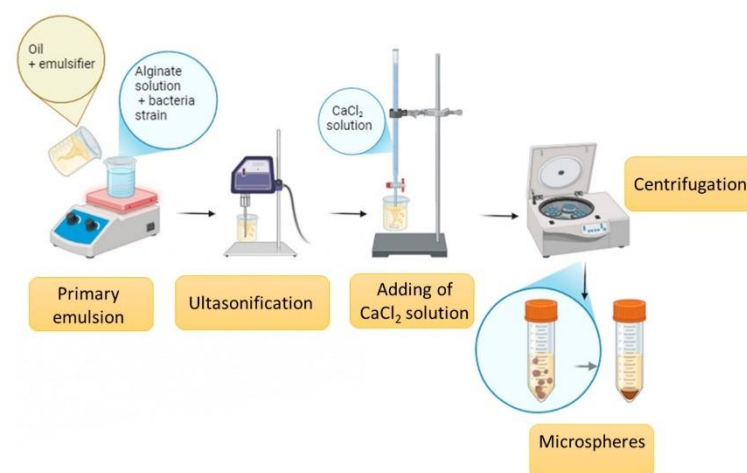
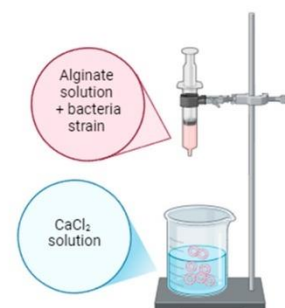
3.3. Preparation of Microcapsules Containing *L. casei* Bacteria

The encapsulation of probiotics was performed using two techniques. Table 6 shows the types of capsules obtained and a schematic description of the process is shown in Figures 10 and 11.

The first technique, emulsification (Figure 3), was conducted according to the methodology described in our previous article [37] and patent application P. 443812 [53] with slight modification. The initial pre-emulsion consisted of encapsulating material (sodium alginate solution and bacterial suspension) with capric/caprylyl triglycerides, and an emulsifier (ECO-Tween 80 or Span 80) was obtained and then ultrasonicated. Next, CaCl_2 (1 mol/L) was added in a dropwise manner into a bacteria-loaded pre-emulsion.

Table 6. The types of capsules obtained with the emulsification and extrusion techniques.

Technique	Type of Capsules	Type of Capsules
Emulsification	Alginate + ECO-Tween 80	Alg/T80
	Alginate + Span 80	Alg/S80
	Alginate + ECO-Tween 80 + trehalose	Alg/T80/Thl
Extrusion	Alginate	Alg
	Alginate + trehalose	Alg/Thl

**Figure 10.** Schematic description of the process of obtaining probiotic microspheres by emulsification [by author].**Figure 11.** Schematic description of the process of obtaining probiotic microspheres by extrusion [by author].

For the extrusion technique (Figure 4), the alginate mixtures containing the bacteria strain were added in a dropwise manner into 100 mL of CaCl_2 (1 mol/L) and left for 30 min for gelation to achieve the alginate beads.

3.4. Freeze-Drying of Encapsulated Probiotics

In order to produce dry capsules, they were frozen at -18°C for 24 h and subsequently dried in a lyophiliser (Lyophilizer Alpha 1-2 LD Plus, Lohra, Germany). As a cryoprotectant, trehalose (10%, *w/v*) was added into the alginate solution during the encapsulation procedure in order to improve the survival of the probiotics during the freeze-drying

process [54]. Ca-Alg capsules both with and without the cryoprotectant were lyophilised with a freeze drier at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 10^{-2} bar for 24 h.

3.5. Encapsulation Efficiency and the Viability of Bacteria over Time

To determine the encapsulation efficiency and viability of bacteria, 1 g of the carriers was dissolved in 9 mL of a 0.2 mol L^{-1} sterile sodium citrate solution (pH 6.0) and the entrapped viable bacteria were subsequently counted by the pour plate technique in MRS agar. The encapsulation efficiency (EE) was calculated by Equation (1).

$$EE = (N/N_o) \times 100\% \quad (1)$$

where the variables were as follows:

N—the number of entrapped viable bacteria cells.

No—the number of free viable bacteria cells before encapsulation.

The viability of probiotic bacteria in the capsules was assessed immediately after the encapsulation process as well as after freeze-drying of the capsules containing the live strain. Moreover, the viability of probiotic bacteria in carriers suspended in the oleogel was assessed immediately after placing them in the gel system, as well as after 7 and 30 days of storage at room temperature. Encapsulation efficiency was also determined for capsules containing the live strain.

3.6. Probiotic-Loaded Capsule Morphology Analysis

The morphology of the obtained probiotic carriers was observed using an SEM device—a scanning electron microscope (Mira3-FEG-SEM, Tescan, Brno-Kohoutovice, Czech Republic) with unipolar emission (Schottky emitter) equipped with a cooling table (Peltier) and an energy dispersive X-ray spectrometer EDX (Oxford Instruments). Samples for testing were prepared by quick freezing in liquid nitrogen and then freeze-drying for 24 h [34,37].

3.7. Preparation of the Oleogels Containing Encapsulated Probiotic Bacteria

In both cases, probiotic bacteria-loaded capsules obtained both by the emulsification and the extrusion technique were added to the oleogels. For this purpose, capsules containing the addition of trehalose (as the cryoprotective agent) were selected, and Tween 80 was used as the emulsifier in the case of the emulsification method.

3.7.1. Preparation of Organogel with Silica (OG-K)

Table 7 shows the composition of the organogel stabilised by Aerosil 200 (OG-K). Both of the ingredients (almond oil and silica) were mixed using the IKA C-MAG HS7 magnetic mixer at a speed of 500 rpm for 5 min. The process was performed at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finally, 1% of probiotic-loaded capsules were added to the obtained oleogel and the mixture was stirred for 5 min, at the temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 7. Composition of prepared base oleogels.

Sample No.	Ingredients (Trade Name)	INCI Name	Concentration [%]
OG-K	Aerosil 200	Silica	5
	Sweet almond oil	Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet Almond) Oil	95
OG-S	Sucragel AOF	Glycerin, Aqua, Sucrose Laurate	30
	Sweet almond oil	Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet Almond) Oil	70

3.7.2. Preparation of Organogel with Sucragel (OG-S)

The organogel with sucragel was obtained by weighing the organogelator constituting 30% of the organogel into a beaker and heating it to a temperature of $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Table 2).

Then, using an IKA C-MAG HS7 magnetic stirrer, the organogelator was stirred with the simultaneous slow addition of sweet almond oil at a speed of 500 rpm. The mixture was stirred for 5 min. After the oleogel cooled to 25 °C, 1% of probiotic capsules were added and the mixture was mixed for an additional 5 min.

3.8. Study of the Physicochemical Properties of the Oleogels

The study of the physicochemical properties of the prepared oleogels was evaluated using the methodology described in our previous manuscript [55]. The physical stability of the obtained formulations was evaluated using a centrifugation test and a thermal stability test. Briefly, in the centrifugation test, 2 mL samples of each oleogel were submitted to centrifugation at 3500 rpm for the duration of 10 min (EBA 20 Hettich Zentrifugen). In the second method, the formulations were placed in the incubator (+40 °C) for 24 h and refrigerated at −20 °C. The procedure was conducted three times. Next, the formulations were visually inspected for any changes in their texture. The pH values were checked using a Mettler Toledo Seven Easy pH meter equipped with a glass Inlab 410 electrode.

3.9. Study of the Microbiological Stability

The microbiological stability of the oleogels were tested using a mikrocount[®] duo test (Schulke, Norderstedt, Germany). The plastic slides were coated on one side with TTC agar (the medium for bacterial count) and on the other side with Rose Bengal CAF agar (the medium for yeast and mould detection) and were dipped in the product samples for 10 s. The slides were then placed back in the sterile tube and incubated at 30 °C for 48 h. For the detection of yeasts, the incubation time was extended for a further 48 h at 30 °C [50].

3.10. Viscoelastic Properties of Base Oleogels and Oleogels with Encapsulated Probiotics

The viscoelastic properties were identified using an oscillation rheometer RS 6000 (Thermo-Haake, Dreieich, Germany). A parallel notched plate system (diameter 35 mm, gap size 1 mm) was used as the measuring element, which enabled the elimination of the slip phenomenon. The prepared samples were placed in the rheometer measuring system and left for 5 min to relax stresses and stabilise the temperature. The tests were performed at two temperatures: 20 °C and 37 °C.

Stress sweep tests were performed in a range from 1 to 100 Pa at a constant frequency of 1 Hz.

The linear viscoelasticity range (LVR) was identified by determining (Haake Rheowin Data Manager 4.93) the point at which the elastic modulus (G') deviates by 5% from the plateau [56]. The dynamic plastic stress (τ) and the corresponding strain (γ) were determined. Mechanical spectra in the range of 0.01 to 10 Hz were identified in the linear viscoelastic range at constant strain (0.4%). The experimental data are described by power Equations (2) and (3):

$$G' = G'_1 \cdot \nu^{m'} \quad (2)$$

$$G'' = G''_1 \cdot \nu^{m''} \quad (3)$$

where G' is the storage modulus (Pa), G'' is the loss modulus (Pa), ν is the frequency (Hz), and G'_1 , G''_1 , m' , and m'' are constants.

4. Conclusions

In this study, stable hybrid systems were developed, specifically oleogel formulations (OG-K and OG-S) containing freeze-dried capsules with the probiotic *L. casei*. The addition of trehalose (a cryoprotective agent) to the capsule composition improved the bacteria survival rate and influenced the shape of the carriers resulting in more compact and regular microcapsules in the form of freeze-dried powders. Moreover, the wall system (Ca–Alg) protects the probiotics from thermal conditions. SEM analysis confirmed significantly smaller sizes of microspheres obtained in the case of the emulsification technique compared to the spheres obtained by the extrusion method. The use of trehalose did not affect the

size of the obtained particles for either method but contributed to the formation of more compact structures.

Studies on the survival of freeze-dried probiotic capsules in oleogels (prepared by both extrusion and emulsification) showed better strain survival in the case of microcapsules prepared using the emulsification technique. In both oleogel systems (OG-K and OG-S), the survival rate of the probiotic strain encapsulated in microspheres was similar. Although the approach based on the introduction of probiotic microcapsules into oleogels is promising, more studies on the delivery of probiotics using such systems should be conducted to verify the advantages of the proposed solution.

Author Contributions: Conceptualisation, A.Ł., M.M. and E.S.; methodology, A.Ł., A.M. and M.L.-S.; formal analysis, A.Ł.; investigation, A.Ł., A.M. and M.L.-S.; resources, M.M. and E.S.; writing—original draft preparation, A.Ł., M.M., E.S., M.L.-S. and M.W.; writing—review and editing, A.Ł., M.M. and E.S.; visualisation, A.Ł. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sikorska, K.; Szulc, J.; Pietkiewicz, J.; Sznitowska, M. Oleożele z Kwasem Salicylowym w Praktyce Leku Recepturowego. *Polish Pharm.* **2009**, *65*, 5–8.
2. Marzec, A. *Chemia Kosmetyków—Surowce, Półprodukty, Preparatyka Wyrobów*; Wydawnictwo Dom Organizatora: Toruń, Poland, 2001.
3. Placek, W. Rola Podłoża i Emolientów w Profilaktyce i Przywracaniu Bariery Naskórkowej. *Dermatol. Estet.* **2005**, *4*, 174–178.
4. Sowa-Kasprzak, K.; Zwawiak, J.; Zaprutko, L. Organogels as Modern Drug Carriers. *Polimery* **2018**, *63*, 169–177. [\[CrossRef\]](#)
5. Żbikowska, A.; Kupiec, M.; Onacik-Gür, S. Wpływ Karagenu Na Teksturę I Stabilność Oleożeli Hydroksypropylometylocelulozowych. *Acta Agroph.* **2017**, *24*, 553–561.
6. Co, E.D.; Marangoni, A.G. Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 749–780. [\[CrossRef\]](#)
7. Patel, A.R.; Dewettinck, K. Comparative Evaluation of Structured Oil Systems: Shellac Oleogel, HPMC Oleogel, and HIPE Gel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 1772–1781. [\[CrossRef\]](#)
8. Ögütçü, M.; Arifoğlu, N.; Yılmaz, E. Preparation and Characterization of Virgin Olive Oil-Beeswax Oleogel Emulsion Products. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **2015**, *92*, 459–471. [\[CrossRef\]](#)
9. Jang, A.; Bae, W.; Hwang, H.S.; Lee, H.G.; Lee, S. Evaluation of Canola Oil Oleogels with Candelilla Wax as an Alternative to Shortening in Baked Goods. *Food Chem.* **2015**, *187*, 525–529. [\[CrossRef\]](#)
10. Pinto, T.C.; Martins, A.J.; Pastrana, L.; Pereira, M.C.; Cerqueira, M.A. Oleogel-Based Systems for the Delivery of Bioactive Compounds in Foods. *Gels* **2021**, *7*, 86. [\[CrossRef\]](#)
11. Davidovich-Pinhas, M. Oleogels. In *Polymeric Gels*; Pal, K., Banerjee, I., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2018; pp. 231–249.
12. Martins, A.J.; Silva, P.; Maciel, F.; Pastrana, L.M.; Cunha, R.L.; Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A. Hybrid Gels: Influence of Oleogel/Hydrogel Ratio on Rheological and Textural Properties. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 1298–1305. [\[CrossRef\]](#)
13. Kulawik-pióro, A.; Miałkowska, M. Polymeric Gels and Their Application in the Treatment of Psoriasis Vulgaris: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Shakeel, A.; Farooq, U.; Iqbal, T.; Yasin, S.; Lupi, F.R.; Gabriele, D. Key Characteristics and Modelling of Bigels Systems: A Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *97*, 932–953. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Lupi, F.R.; Gabriele, D.; Facciolo, D.; Baldino, N.; Seta, L.; de Cindio, B. Effect of Organogelator and Fat Source on Rheological Properties of Olive Oil-Based Organogels. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 177–184. [\[CrossRef\]](#)
16. Almeida, I.F.; Bahia, M.F. Evaluation of the Physical Stability of Two Oleogels. *Int. J. Pharm.* **2006**, *327*, 73–77. [\[CrossRef\]](#)
17. Da Pieve, S.; Calligaris, S.; Panozzo, A.; Arrighetti, G.; Nicoli, M.C. Effect of Monoglyceride Organogel Structure on Cod Liver Oil Stability. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2978–2983. [\[CrossRef\]](#)
18. Hughes, N.E.; Marangoni, A.G.; Wright, A.J.; Rogers, M.A.; Rush, J.W.E. Potential Food Applications of Edible Oil Organogels. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 470–480. [\[CrossRef\]](#)

19. Rocha, J.C.B.; Lopes, J.D.; Mascarenhas, M.C.N.; Arellano, D.B.; Guerreiro, L.M.R.; da Cunha, R.L. Thermal and Rheological Properties of Organogels Formed by Sugarcane or Candelilla Wax in Soybean Oil. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 318–323. [\[CrossRef\]](#)
20. Toro-Vazquez, J.F.; Morales-Rueda, J.A.; Dibildox-Alvarado, E.; Charó-Alonso, M.; Alonzo-Macias, M.; González-Chávez, M.M. Thermal and Textural Properties of Organogels Developed by Candelilla Wax in Safflower Oil. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84*, 989–1000. [\[CrossRef\]](#)
21. Patel, A.R.; Mankoč, B.; Bin Sintang, M.D.; Lesaffer, A.; Dewettinck, K. Fumed Silica-Based Organogels and “aqueous-Organic” Bigels. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 9703–9708. [\[CrossRef\]](#)
22. Lu, Z.; Fassihi, R. Influence of Colloidal Silicon Dioxide on Gel Strength, Robustness, and Adhesive Properties of Diclofenac Gel Formulation for Topical Application. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 636–644. [\[CrossRef\]](#)
23. Shakeel, A.; Farooq, U.; Gabriele, D.; Marangoni, A.G.; Lupi, F.R. Bigels and Multi-Component Organogels: An Overview from Rheological Perspective. *Food Hydrocoll.* **2021**, *111*, 106190. [\[CrossRef\]](#)
24. Blach, C.; Gravelle, A.J.; Peyronel, F.; Weiss, J.; Barbut, S.; Marangoni, A.G. Revisiting the Crystallization Behavior of Stearyl Alcohol: Stearic Acid (SO: SA) Mixtures in Edible Oil. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 81151–81163. [\[CrossRef\]](#)
25. Uvanesh, K.; Sagiri, S.S.; Senthilguru, K.; Pramanik, K.; Banerjee, I.; Anis, A.; Al-Zahrani, S.M.; Pal, K. Effect of Span 60 on the Microstructure, Crystallization Kinetics, and Mechanical Properties of Stearic Acid Oleogels: An In-Depth Analysis. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, E380–E387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Bin Sintang, M.D.; Danthine, S.; Brown, A.; Van de Walle, D.; Patel, A.R.; Tavernier, I.; Rimaux, T.; Dewettinck, K. Phytosterols-Induced Viscoelasticity of Oleogels Prepared by Using Monoglycerides. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 832–840. [\[CrossRef\]](#)
27. Bot, A.; Agterof, W.G.M. Structuring of Edible Oils by Mixtures of γ -Oryzanol with β -Sitosterol or Related Phytosterols. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 513–521. [\[CrossRef\]](#)
28. Patel, A.R.; Cludts, N.; Sintang, M.D.B.; Lesaffer, A.; Dewettinck, K. Edible Oleogels Based on Water Soluble Food Polymers: Preparation, Characterization and Potential Application. *Food Funct.* **2014**, *5*, 2833–2841. [\[CrossRef\]](#)
29. de Vries, A.; Wesseling, A.; van der Linden, E.; Scholten, E. Protein Oleogels from Heat-Set Whey Protein Aggregates. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *486*, 75–83. [\[CrossRef\]](#)
30. Suzuki, M.; Setoguchi, C.; Shirai, H.; Hanabusa, K. Organogelation by Polymer Organogelators with a L-Lysine Derivative: Formation of a Three-Dimensional Network Consisting of Supramolecular and Conventional Polymers. *Chem.-A Eur. J.* **2007**, *13*, 8193–8200. [\[CrossRef\]](#)
31. Zhao, W.; Wei, Z.; Xue, C. Recent Advances on Food-Grade Oleogels: Fabrication, Application and Research Trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 7659–7676. [\[CrossRef\]](#)
32. Legesse Bedada, T.; Feto, T.K.; Awoke, K.S.; Garedew, A.D.; Yifat, F.T.; Birri, D.J. Probiotics for Cancer Alternative Prevention and Treatment. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110409. [\[CrossRef\]](#)
33. Górka, A.; Przystupski, D.; Niemczura, M.J.; Kulbacka, J. Probiotic Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy. *Curr. Microbiol.* **2019**, *76*, 939–949. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Effect of Encapsulation of Lactobacillus Casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16*, 52878–52893. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Ostrowska, P.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Probiotics-Loaded Microspheres for Cosmetic Applications. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 1183. [\[CrossRef\]](#)
36. Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 3834. [\[CrossRef\]](#)
37. Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Design of Alginate Microspheres Formulation as a Probiotics Carrier. *Chem. Process Eng. New Front.* **2023**, *44*, e20. [\[CrossRef\]](#)
38. Pupa, P.; Apiwatsiri, P.; Sirichokchatchawan, W.; Pirarat, N.; Muangsiri, N.; Shah, A.A.; Prapasarakul, N. The Efficacy of Three Double-Microencapsulation Methods for Preservation of Probiotic Bacteria. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13753. [\[CrossRef\]](#)
39. Muthukumarasamy, P.; Holley, R.A. Microbiological and Sensory Quality of Dry Fermented Sausages Containing Alginate-Microencapsulated Lactobacillus Reuteri. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *111*, 164–169. [\[CrossRef\]](#)
40. Nualkaekul, S.; Lenton, D.; Cook, M.T.; Khutoryanskiy, V.V.; Charalampopoulos, D. Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum in Pomegranate Juice. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1281–1287. [\[CrossRef\]](#)
41. Mokarram, R.R.; Mortazavi, S.A.; Najafi, M.B.H.; Shahidi, F. The Influence of Multi Stage Alginate Coating on Survivability of Potential Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal Juice. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1040–1045. [\[CrossRef\]](#)
42. Rokka, S.; Rantamäki, P. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
43. Halim, M.; Mohd Mustafa, N.A.; Othman, M.; Wasoh, H.; Kapri, M.R.; Ariff, A.B. Effect of Encapsulant and Cryoprotectant on the Viability of Probiotic Pedicoccus Acidilactici ATCC 8042 during Freeze-Drying and Exposure to High Acidity, Bile Salts and Heat. *LWT* **2017**, *81*, 210–216. [\[CrossRef\]](#)
44. Heidebach, T.; Först, P.; Kulozik, U. Influence of Casein-Based Microencapsulation on Freeze-Drying and Storage of Probiotic Cells. *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 309–316. [\[CrossRef\]](#)
45. Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R.P. Anhydrobiotics: The Challenges of Drying Probiotic Cultures. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1406–1416. [\[CrossRef\]](#)

46. Carvalho, A.; Teixeira, P.; Gibbs, P.; Carvalho, A.S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, F.X.; Gibbs, P. Relevant Factors for the Preparation of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 835–847. [CrossRef]
47. Han, C.; Xiao, Y.; Liu, E.; Su, Z.; Meng, X.; Liu, B. Preparation of Ca-Alginate-Whey Protein Isolate Microcapsules for Protection and Delivery of *L. Bulgaricus* and *L. Paracasei*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 1361–1368. [CrossRef]
48. Fowler, A.; Toner, M. Cryo-Injury and Biopreservation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1066*, 119–135. [CrossRef]
49. Zhuang, X.; Gaudino, N.; Clark, S.; Acevedo, N.C. Novel Lecithin-Based Oleogels and Oleogel Emulsions Delay Lipid Oxidation and Extend Probiotic Bacteria Survival. *LWT* **2021**, *136 Pt 2*, 110353. [CrossRef]
50. Schülke & Mayr GmbH. Product Information: Mikrocount® Duo. Available online: <https://www.schuelke.com/pl-pl/products.php> (accessed on 20 October 2024).
51. Wu, X.J.; Wang, Y.; Yang, W.; Xie, B.H.; Yang, M.B.; Dan, W. A Rheological Study on Temperature Dependent Microstructural Changes of Fumed Silica Gels in Dodecane. *Soft Matter* **2012**, *8*, 10457–10463. [CrossRef]
52. Patel, A.R.; Babaahmadi, M.; Lesaffer, A.; Dewettinck, K. Rheological Profiling of Organogels Prepared at Critical Gelling Concentrations of Natural Waxes in a Triacylglycerol Solvent. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4862–4869. [CrossRef]
53. Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Sposób Otrzymywania Mikrokapsulek Zawierających Bakterie Probiotyczne. Patent 443812, 16 February 2023.
54. Agudelo, J.; Cano, A.; González-Martínez, C.; Chiralt, A. Disaccharide Incorporation to Improve Survival during Storage of Spray Dried Lactobacillus Rhamnosus in Whey Protein-Maltodextrin Carriers. *J. Funct. Foods* **2017**, *37*, 416–423. [CrossRef]
55. Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Probiotic Raw Materials as Active Ingredients of Cosmetic Formulations. *Przem. Chem.* **2022**, *1*, 81–85. [CrossRef]
56. Espert, M.; Hernández, M.J.; Sanz, T.; Salvador, A. Rheological Properties of Emulsion Templated Oleogels Based on Xanthan Gum and Different Structuring Agents. *Curr. Res. Food Sci.* **2022**, *5*, 564–570. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Effect of Encapsulation of *Lactobacillus casei* in Alginate–Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria

Anna Łętocha,* Alicja Michalczyk, Małgorzata Miastkowska, and Elżbieta Sikora



Cite This: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2024, 16, 52878–52893



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: To realize the health benefits of probiotic bacteria, they must withstand processing and storage conditions and remain viable after use. The encapsulation of these probiotics in the form of microspheres containing tapioca flour as a prebiotic and vehicle component in their structure or shell affords symbiotic effects that improve the survival of probiotics under unfavorable conditions. Microencapsulation is one such method that has proven to be effective in protecting probiotics from adverse conditions while maintaining their viability and functionality. The aim of the work was to obtain high-quality microspheres that can act as carriers of *Lactobacillus casei* bacteria and to assess the impact of encapsulation on the viability of probiotic microorganisms in alginate microspheres enriched with a prebiotic (tapioca flour) and additionally coated with hyaluronic acid, chitosan, or gelatin. The influence of the composition of microparticles on the physicochemical properties and the viability of probiotic bacteria during storage was examined. The optimal composition of microspheres was selected using the design of experiments using statistical methods. Subsequently, the size, morphology, and cross-section of the obtained microspheres, as well as the effectiveness of the microsphere coating with biopolymers, were analyzed. The chemical structure of the microspheres was identified by using Fourier-transform infrared spectrophotometry. Raman spectroscopy was used to confirm the success of coating the microspheres with the selected biopolymers. The obtained results showed that the addition of tapioca flour had a positive effect on the surface modification of the microspheres, causing the porous structure of the alginate microparticles to become smaller and more sealed. Moreover, the addition of prebiotic and biopolymer coatings of the microspheres, particularly using hyaluronic acid and chitosan, significantly improved the survival and viability of the probiotic strain during long-term storage. The highest survival rate of the probiotic strain was recorded for alginate–tapioca flour microspheres coated with hyaluronic acid, at 5.48 log CFU g^{−1}. The survival rate of *L. casei* in that vehicle system was 89% after storage for 30 days of storage.

KEYWORDS: microspheres, tapioca flour, alginate, probiotics, biopolymers, *Lactobacillus casei*

INTRODUCTION

According to the generally accepted definition established by FAO and WHO, “probiotics are live microorganisms that, when administered in appropriate amounts, provide the host with health benefits.”^{1,2} The most common probiotics are bacteria in the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) defines prebiotics as “nondigestible food ingredients that, when consumed in sufficient amounts, selectively stimulate the growth and/or activity of one or a limited number of microbes in the colon resulting in documented health benefits.”^{2,3}

The combination of probiotics and prebiotics results in symbiotic activity that improves the survival of bacteria in unfavorable conditions, for example, in the stomach. The most well-known prebiotic is inulin.¹ Another well-studied prebiotic

is resistant starch (hi-maize). Starch is a common, biodegradable, nontoxic, edible, and relatively inexpensive material.⁴ Several reports describe the use of starch to encapsulate food ingredients^{5,6} and drugs.^{7,8} Starch granules are an accumulation of many starch molecules that consist of linear amylose and highly branched amylopectin.^{9,10} The higher content of amylose in tapioca flour (17–23%) may be responsible for the more efficient encapsulation of active substances.^{4,10}

Received: June 20, 2024

Revised: September 5, 2024

Accepted: September 5, 2024

Published: September 20, 2024



However, to achieve the health benefits attributed to the use of probiotics (both in food and cosmetic products), the live bacteria must withstand processing and storage conditions and remain viable after application. In combination with prebiotics, microencapsulation has been shown to be an effective method to protect probiotics from these adverse conditions while maintaining their viability and functionality.¹¹ Additionally, in the case of cosmetic products, the use of microcapsules or microspheres offers a solution to the incompatibility of substances when using different active substances in a single formula.¹² In addition, microparticles enable the encapsulation of substances with an unpleasant odor, and the obtained formulations have a weak or no odor. When probiotics are used in cosmetic formulations, the microencapsulation process may support the survival of microorganisms despite the presence of preservatives.^{11,13} The beneficial properties of probiotics are still underestimated and underutilized in the cosmetics industry. For this reason, our research is focused on the possibility of designing functional microspheres as carriers of probiotic bacteria with potential applications in cosmetic products dedicated to people with skin problems. Restoring the balance of the bacterial microflora will translate into the proper functioning of the microbiome that can promote skin immunity and provide host defense, including protection against skin inflammation, infections, wounds, and skin cancer.¹⁴

Emulsification is one of the most common microencapsulation techniques.¹⁵ In this technique, the polymer solution containing the encapsulated substance is emulsified in the oil phase to form a water-in-oil (W/O) emulsion. Thereafter, a cross-linking compound is gradually added to the emulsion, causing the emulsion droplets to gel and form microparticles.^{11,16}

Therefore, the aim of this study was to obtain high-quality microspheres through an emulsification process and to evaluate the effect of *Lactobacillus casei* encapsulation on the viability of probiotic bacteria in alginate–tapioca flour microspheres and microspheres coated with various biopolymers including hyaluronic acid, chitosan, and gelatin.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Alginic acid sodium salt from brown algae, MRS broth, de Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar, and sodium citrate were purchased from Sigma-Aldrich (Poland). Tapioca flour was purchased from Green Essence (Poland). Calcium chloride was purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A. Caprylic/capric triglycerides and ECO-Tween 80 were kindly supplied by Croda (Poland). Chitosan (85% deacetylation) and gelatin (type I) were purchased from Sigma-Aldrich (Poland). Hyaluronic acid sodium salt (0.05–0.1 MDa) was kindly supplied by Alfa Sagittarius (Poland). The probiotic bacteria *L. casei* strain ATCC 393 was purchased from American Type Culture Collection.

Preparation of the *L. casei* Suspension for Encapsulation. A 250 μ L aliquot of the bacterial suspension was transferred into 25 mL of MRS broth contained in an Erlenmeyer flask and incubated at 30 °C under aerobic conditions for 48 h. The cells were harvested when the suspension was in the logarithmic phase by centrifugation at 3000g for 10 min at 4 °C. The collected cells were washed twice with sterile saline (0.9%) (w/v). The cell pellets were resuspended in saline solution to obtain concentrations ranging from 9 log CFU/mL to 10 log CFU/mL. The bacterial cell count of the cell suspension was determined by counting the cells on plates in MRS agar (37 °C, 72 h culture) using the pour plate inoculation technique.¹⁷ The obtained bacterial suspensions were used for the microencapsulation procedure.

Assessment of the Effect of Tapioca Flour Concentration on the Growth of the *L. casei* Strain. This assessment study was based on the methodology of Shafizadeh et al., with slight modifications.¹⁸ To determine the optimal concentration of tapioca flour required to encapsulate *L. casei*, an appropriate amount of flour was put into liquid MRS to obtain relevant concentrations: 0.5, 1, 2, 4, and 5%. MRS broth without any flour was used as the control. All media prepared in 25 mL quantities in 50 mL Erlenmeyer flasks were sterilized at 121 °C for 15 min in an autoclave. After cooling, the media were inoculated with 1 mL of 48-h *L. casei* culture and incubated for another 48 h at 37 °C under aerobic conditions. *L. casei* bacteria were counted by a serial 10-fold dilutions in sterile saline (0.9%) (w/v). Next, the live bacteria cell count in the medium was determined by counting the cells on plates in MRS agar (37 °C, 72 h culture) using the pour plate inoculation technique. Moreover, after growing the *L. casei* strain on liquid medium with flour, the pH of the culture medium was determined using a pH meter (Mettler Toledo). All tests were performed in triplicate, maintaining the principles of sterility.

Encapsulation of *L. casei*. The encapsulation of *L. casei* was performed in accordance with the modified methodology described by Łętocha et al.¹⁵ and in the patent application P. 443812.¹⁹ Briefly, a pre-emulsion was prepared by mixing the encapsulating material (sodium alginate solution, prebiotic solution, and bacterial suspension) with capric/caprylic triglycerides and emulsifier (ECO-Tween 80). An aqueous solution of calcium chloride was added dropwise to the solution to cross-link the microspheres. Then, the obtained microspheres were separated from the emulsion by centrifugation (EBA 20, Hettich Zentrifugen). All solutions used for encapsulation were previously sterilized.

Optimization of Composition. The composition of microspheres was optimized using mathematical methods (Statistica ver. 13, StatSoft, Poland). To develop the best parameters for the alginate microspheres (AMs) recipe, the design of experiments (DOE) statistical method with the $3^{(K-p)}$ fractional plan was used. In this plan, K is the number of variables, and p always takes the value 1. First, the variables influencing the properties of the final alginate microspheres were determined. The group of input parameters included the amount of emulsifier, the concentration of the prebiotic and alginate solutions, and the mass ratio of alginate to prebiotic. The ranges of the process-independent variables are listed in Table 1.

Table 1. Ranges of Process-Independent Variables

independent variable	the ranges of variability
emulsifier concentration (%)	1, 2, 3
concentration of tapioca flour (prebiotic) solution (%)	2, 4, 6
concentration of alginate solution (%)	2, 3, 4
mass ratio alginate to prebiotic (%)	1, 2, 3

Determination of Microdispersion Droplet Size. To determine the size of the microspheres obtained, the microdispersion was analyzed using an optical microscope before centrifugation. For this test, a small amount of the microdispersion was placed on a glass slide and covered with a coverslip. Observations were made using a Motic B1 Advanced Series microscope equipped with a digital camera. The average $\pm$ standard deviation (SD) droplet diameter for each sample was determined on the basis of 200 measurements.

Viscosity Measurements. The rheological properties of the obtained formulations were determined using a rotational rheometer (Brookfield Model R/S Plus) at room temperature (25 °C), with a shear rate of up to 500 s^{-1} , over 60 s.

Coating of Alginate Microspheres. The alginate microspheres were coated with chitosan, gelatin, or hyaluronic acid. The pH values of the coating solutions were checked using a Mettler Toledo Seven Easy pH meter equipped with a glass Inlab 410 electrode. The alginate microspheres were coated in accordance with the method-

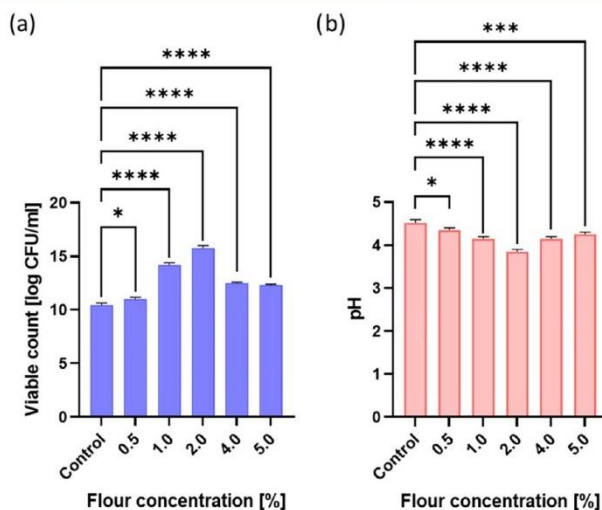


Figure 1. Viable count (log CFU/mL) and pH of *L. casei* values ((a, b) respectively) of the samples containing different concentrations of tapioca flour (error bars represent the SD of the related data). * $p = 0.05$ – 0.011 ; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

ology of Krasaekoopt et al.²⁰ and Zanjani et al.²¹ Briefly, microspheres (10 g) were immersed in 100 mL of each sterile solution (previously autoclaved at 121 °C for 15 min), coated by stirring for 40 min using a magnetic stirrer, separated by filtration, and rinsed with deionized water.

Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis. The morphology and cross-section of the obtained microspheres were observed using a scanning electron microscope (Mira3-FEG-SEM, Tescan, Brno-Kohoutovice, Czech Republic) with a one-pole emission (Schottky emitter) equipped with an X-ray energy dispersive spectrometer EDX (Oxford Instruments) and a cooling table (Peltier), operated at a temperature of -30 °C. The samples for SEM investigations were prepared by rapid freezing in liquid nitrogen followed by freeze-drying for 24 h.^{22–24}

Fourier-Transform Infrared (FTIR) Analysis. To identify the chemical structure of the microspheres, attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectrophotometry analysis was performed using a Thermo Scientific Nicolet iS5 FTIR spectrometer equipped with an iD7 ATR accessory. The lyophilized microspheres were meshed and mounted onto the ATR crystal for analysis. The infrared spectra were recorded at wavelengths between 400 and 4000 cm^{-1} .

Raman Spectroscopy Analysis. To confirm the success of the biopolymer coating, Raman spectroscopy was used. All Raman measurements were performed by using a WITec α 300R spectrometer equipped with a confocal microscope, TrueSurface attachment, and charge-coupled device (CCD) detector. For this purpose, a laser line with excitation at a wavelength of 532 nm, an air lens with a magnification of 50 $\times$, and a numerical aperture of 0.75 were used. The radiation power at the focus point was 15–17 mW, and the spectral resolution of the collected spectra was approximately 4 cm^{-1} . For single spectra recorded for standards and uncoated microspheres, the following parameters were used: number of accumulations, 20; accumulation time for one spectrum, 0.5 s. In each case, three spectra were recorded and then averaged within a given sample.

Assessment of the *L. casei* Strain Viability and the Effectiveness of Its Encapsulation. To determine bacterial viability (spheres AMs, APMs, and APMs coated with various substances) and the encapsulation effectiveness (spheres APMs in the

DOE experiment), a previously described method was used.¹³ To count trapped bacteria, 1 g of spheres was added to 9 mL of 2% (w/v) sterile sodium citrate at a concentration of 0.2 mol/L (pH 6.0), and the mixture was stirred for 10 min. Next, serial dilutions were prepared, and the obtained solutions were inoculated using the pour plate method (1 mL) on MRS agar plates. Viable cells were counted from the number of colonies after being incubated for 72 h at 37 °C under aerobic conditions. All tests were performed in triplicate, maintaining the principles of sterility. The results are presented as the logarithm of colony-forming units per gram (log CFU g^{-1}) and as a survival percentage.

The microencapsulation efficiency (EE) (%) of *L. casei* was calculated from eq 1 and presented as the percentage log CFU g^{-1} .²⁵

$$\text{EE (\%)} = (N/\text{No}) \times 100 \quad (1)$$

In the formula, N stands for the number of bacterial cells trapped in the microspheres and No stands for the number of free *L. casei* cells added during encapsulation.^{18,25}

Statistical Analysis. All data concerning the mean droplet size and viscosity of formulations, assessments of the effect of flour concentration on the growth of the strain, and the viability of the *L. casei* strain in microspheres were presented as the mean of three different experiments $\pm$ SD. The differences between the calculated means of each individual group were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) tests, using the statistical software Statistica Version 12 StatSoft Company (Kraków, Poland), and GraphPad Prism. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Various Concentrations of Tapioca Flour on the Growth of the *L. casei* Strain. The effects of various concentrations (0.5, 1, 2, 4, and 5%) of tapioca flour on the growth of the *L. casei* strain and pH changes during MRS broth fermentation are presented in Figure 1a,b, respectively. An increase in the concentration of flour has a positive effect on the growth of the probiotic strain, but causes a decrease in the pH of the growth medium.

The most intense growth of the strain took place when the concentration of flour in the medium was 1 and 2%. The

Table 2. Matrix Showing the Experimental Design for Microsphere Composition and the Experimental Data Obtained for the Dependent Variables

sample no.	independent variables				dependent variables			
	emulsifier (%)	prebiotic (%)	alginate (%)	mass ratio alginate to prebiotic (%)	viscosity (Pa s)	size (μm)	EE after 24 h (log CFU/g)	viability after 7 days (log CFU/g)
25	3.0	6.0	2.0	3	1.175 $\pm$ 0.12	37 $\pm$ 5	9.43 $\pm$ 0.20	9.3 $\pm$ 0.20
1	1.0	2.0	2.0	1	0.550 $\pm$ 0.04	30 $\pm$ 2	9.13 $\pm$ 0.25	8.6 $\pm$ 0.12
22	3.0	4.0	2.0	1	0.720 $\pm$ 0.04	109 $\pm$ 12	8.54 $\pm$ 0.10	2.4 $\pm$ 0.10
4	1.0	4.0	2.0	3	1.685 $\pm$ 0.10	99 $\pm$ 9	8.43 $\pm$ 0.10	0
19	3.0	2.0	2.0	2	0.910 $\pm$ 0.08	57 $\pm$ 7	7.84 $\pm$ 0.15	7.7 $\pm$ 0.12
20	3.0	2.0	3.0	1	0.580 $\pm$ 0.06	48 $\pm$ 6	8.44 $\pm$ 0.16	8.2 $\pm$ 0.15
11	2.0	2.0	3.0	2	1.155 $\pm$ 0.09	67 $\pm$ 6	8.45 $\pm$ 0.17	8.2 $\pm$ 0.15
15	2.0	4.0	4.0	3	2.823 $\pm$ 0.17	48 $\pm$ 7	9.24 $\pm$ 0.10	6.1 $\pm$ 0.10
7	1.0	6.0	2.0	2	1.123 $\pm$ 0.12	101 $\pm$ 15	9.08 $\pm$ 0.16	8.4 $\pm$ 0.12
16	2.0	6.0	2.0	1	1.304 $\pm$ 0.08	77 $\pm$ 8	8.45 $\pm$ 0.20	8.5 $\pm$ 1.12
12	2.0	2.0	4.0	1	1.661 $\pm$ 0.14	36 $\pm$ 1	9.41 $\pm$ 0.13	9.2 $\pm$ 0.10
13	2.0	4.0	2.0	2	0.783 $\pm$ 0.05	46 $\pm$ 4	9.6 $\pm$ 0.11	5.7 $\pm$ 0.15
6	1.0	4.0	4.0	1	2.751 $\pm$ 0.18	164 $\pm$ 17	9.24 $\pm$ 0.12	4.9 $\pm$ 0.13
10	2.0	2.0	2.0	3	0.929 $\pm$ 0.08	46 $\pm$ 3	8.8 $\pm$ 0.15	8.1 $\pm$ 0.18
28	2.0	4.0	3.0	2	1.322 $\pm$ 0.12	74 $\pm$ 8	9.11 $\pm$ 0.15	4.8 $\pm$ 0.12
18	2.0	6.0	4.0	2	2.617 $\pm$ 0.17	55 $\pm$ 4	8.18 $\pm$ 0.18	8.5 $\pm$ 0.10
2	1.0	2.0	3.0	3	1.480 $\pm$ 0.09	53 $\pm$ 3	8.45 $\pm$ 0.20	8.3 $\pm$ 0.15
27	3.0	6.0	4.0	1	2.890 $\pm$ 0.20	41 $\pm$ 2	8.13 $\pm$ 0.17	8.1 $\pm$ 0.11
21	3.0	2.0	4.0	3	2.617 $\pm$ 0.23	26 $\pm$ 3	7.89 $\pm$ 0.25	7.8 $\pm$ 0.25
24	3.0	4.0	4.0	2	2.760 $\pm$ 0.12	42 $\pm$ 4	8.01 $\pm$ 0.15	3.2 $\pm$ 0.10
26	3.0	6.0	3.0	2	1.580 $\pm$ 0.08	43 $\pm$ 4	8.21 $\pm$ 0.15	7.8 $\pm$ 0.12
23	3.0	4.0	3.0	3	1.720 $\pm$ 0.05	44 $\pm$ 5	8.14 $\pm$ 0.12	5.5 $\pm$ 0.15
3	1.0	2.0	4.0	2	2.513 $\pm$ 0.17	59 $\pm$ 6	9.44 $\pm$ 0.10	8.4 $\pm$ 0.11
9	1.0	6.0	4.0	3	3.290 $\pm$ 0.24	104 $\pm$ 15	7.99 $\pm$ 0.18	2.3 $\pm$ 0.10
8	1.0	6.0	3.0	1	1.155 $\pm$ 0.07	64 $\pm$ 7	9.34 $\pm$ 0.11	5.1 $\pm$ 0.14
17	2.0	6.0	3.0	3	1.627 $\pm$ 0.07	38 $\pm$ 3	8.55 $\pm$ 0.14	0
14	2.0	6.0	3.0	1	1.815 $\pm$ 0.02	56 $\pm$ 7	8.16 $\pm$ 0.15	7.2 $\pm$ 0.15
5	1.0	6.0	3.0	2	1.712 $\pm$ 0.05	42 $\pm$ 6	8.58 $\pm$ 0.20	0

concentration of *L. casei* was then equal to 14.39 and 15.79 log CFU/mL, respectively. Thus, it is higher than the concentration of *L. casei* cells in the control (sample without flour: 10.6 log CFU/mL) by 3.79 and 5.19 log CFU/mL, respectively. The samples mentioned above also had the lowest pH values of 4.1 (flour concentration 1%) and 3.9 (flour concentration 2%). The less intense growth rate of *L. casei* with the flour content of over 2% in an MRS medium can be associated with the increased viscosity of the medium after the addition of flour, as observed by Bustamante et al. after using the additive of flaxseed mucus.²⁶

Tapioca flour is primarily composed of carbohydrates (87.5%), mainly starch, and proteins (0.1%).²⁷ Thus, it can be a source of carbon during the process of growth and development of *L. casei* bacteria in addition to glucose contained in the MRS agar. The flour can also be a substrate in the biosynthesis of organic acids such as lactic, propionic, or formic acid.²⁶ As the increased concentration of tapioca flour results in the presence of more sugar compounds, bacterial growth and their activity might be more affected, resulting in higher concentrations of hydrogens ion and a reduction in the pH of the MRS medium.¹⁸ The possibility of using enzymatically hydrolyzed tapioca flour as a source of carbon to promote growth of the *Lactococcus lactis* IO-1 (JCM7638) strain and concurrently as a substrate for lactic acid fermentation was previously suggested by Onet.²⁸ Shamala and Sreekantiah proposed similar conclusions and indicated the possibility of utilizing unrefined tapioca flour in the

production of lactic acid and *Lactobacillus plantarum* biomass for medical use.²⁹ Based on the available data, bacteria of the *Lactobacillus* genus, especially the species *L. casei*, *L. plantarum*, and *Lactobacillus acidophilus*, have the ability to metabolize various oligosaccharides, including starch, into simple sugars and use them as a carbon source for growth and the synthesis of organic acids.^{30,31}

Results of Experimental Design for Microsphere Composition. The composition of alginate–prebiotic microspheres was optimized using mathematical methods. The viscosity, size, encapsulation efficiency, and viability after 7 days were classified as the output parameters. Table 2 shows the specific values of process composition and the results of the physicochemical analyses and viability over time of probiotic bacteria.

Based on the graphs, it can be concluded that the parameters with a statistically significant influence on the viscosity of the obtained microspheres are the concentration of alginate solution as a linear and square function (indicating the strong influence of alginate concentration on viscosity), the concentration of prebiotic solution, and the mass ratio of alginate to prebiotic as a linear function (Figure 2a). Moreover, the concentration of emulsifier (linear function) and concentration of prebiotic solution (quadratic function) are parameters that have a statistically significant influence on the size of the microspheres (Figure 2b). For the input parameters of encapsulation efficiency (EE) (Figure 2c) and viability after 7 days (Figure 2d), the statistically significant parameters are

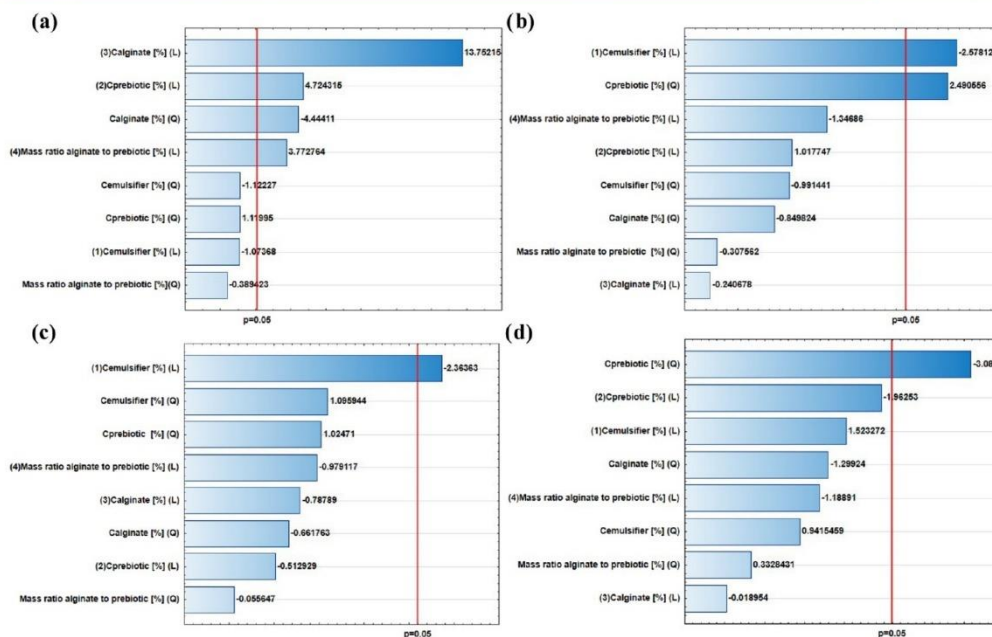


Figure 2. Pareto charts showing the influence of independent parameters on: (a) viscosity (Pa s), (b) size (μm), (c) encapsulation efficiency (EE) after 24 h (log CFU/g), and (d) viability after 7 days (log CFU/g).

the emulsifier concentration (linear function) and prebiotic solution concentration (square function), respectively.

The next phase of the statistical analysis included the approximation profiles. The approximation profiles are presented in Figure 3 and show which values of the input parameters achieve the most desirable values of the output variables. The most desirable values are the smallest viscosity, the size of the microspheres (to ensure that bacterial encapsulation will be possible, i.e., not less than $1\ \mu\text{m}$), the highest encapsulation efficiency, and the viability of probiotic bacteria over time.

The analysis of the approximation profiles (Figure 3) shows that the microspheres with the smallest viscosity (0.550 Pa s) and size ($26\ \mu\text{m}$) and the highest EE (9.6 log CFU/g) and viability over time (9.3 log CFU/g) were obtained for the lowest concentration of alginate solution (2%) and prebiotic solution (2%), intermediate emulsifier concentration (2%), and 1.5% mass ratio of alginate to prebiotic. The graphs also show that the viscosity of the microspheres increases as the concentration of alginate and prebiotic solutions and the mass ratio of alginate to prebiotic are increased. The size of the prebiotic microspheres decreases as the emulsifier concentration increases. However, the efficiency of encapsulation also decreases, which is in contrast to the expected effect. Additionally, when the mass ratio of alginate to prebiotic is increased, the EE and bacterial viability decreased over time.

Figure 4 shows the surface response plots for the most desirable microsphere composition, i.e., emulsifier and prebiotic concentrations, and alginate and prebiotic concentrations; the range was extended by model calculations.

The data presented in Figure 4 show that to obtain the microspheres with the desired parameters, such as the smallest droplet size and the lowest viscosity, and the highest EE and viability over time of probiotic bacteria, the concentrations of the emulsifier and prebiotic solution should be in the range of 1.0 to 2.5% and below 1.5%, respectively. However, in the case of the influence of the concentrations of prebiotic and alginate solutions on desirability, the most optimal values were in the ranges of 1.8–2.2 and 1.5–1.6%, respectively.

Based on the design of experiments (DOE) results, the alginate–prebiotic microspheres (Table 3) were prepared as well as other coatings. Additionally, optical micrographs of alginate–prebiotic microspheres containing probiotic *L. casei* are shown in Figure 5.

SEM Analysis. The surface morphology and cross-section of alginate microspheres reference sample¹³ and alginate–prebiotic microspheres were analyzed using scanning electron microscopy (SEM) (Figure 6).

The alginate microspheres (Figure 6a) were generally spherical with a wrinkled surface.^{11,32} The wrinkled surface was probably a result of the water content lost during the freeze-drying process.^{33–35} Dolly et al.³⁶ reported that during the lyophilization of polysaccharide hydrogel spheres, ice crystals were formed at the low temperatures to which the spheres were exposed to during preparation for freeze-drying. After sublimation of the ice crystals under reduced pressure, a porous, dry, and spongy matrix is formed. In turn, Fareez et al.³⁷ linked surface irregularities of the particles to higher concentrations of polymer in specific regions of the closed spheres. The addition of tapioca flour did not change the shape

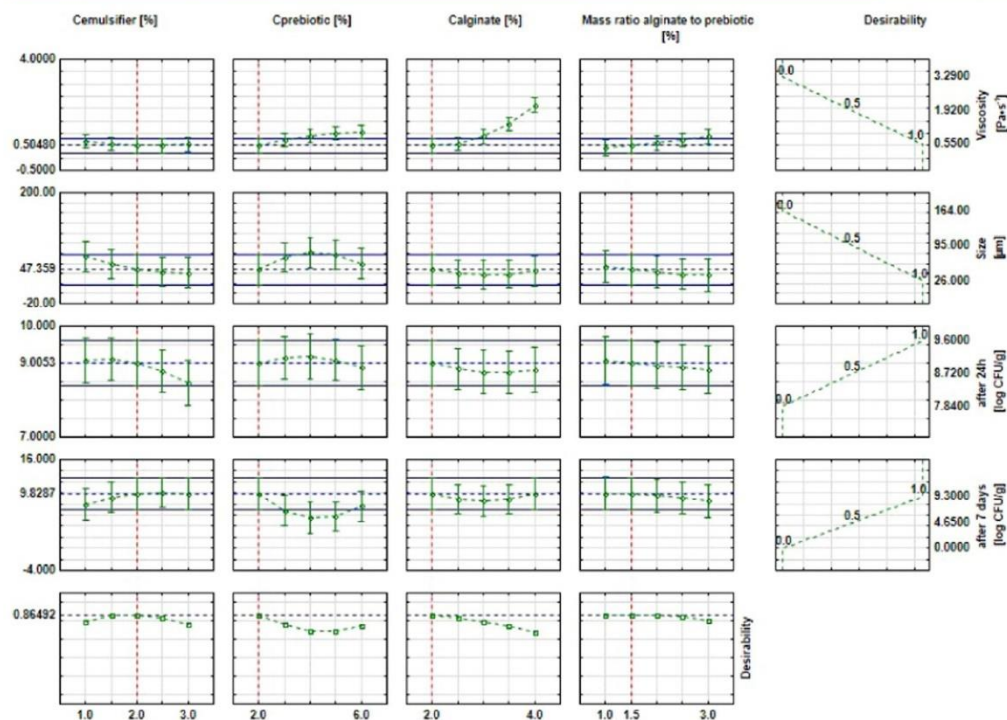


Figure 3. Approximation profiles for the influence of independent parameters on: viscosity [Pa·s], size [μm], encapsulation efficiency after 24 h [log CFU/g] and viability after 7 days [log CFU/g].

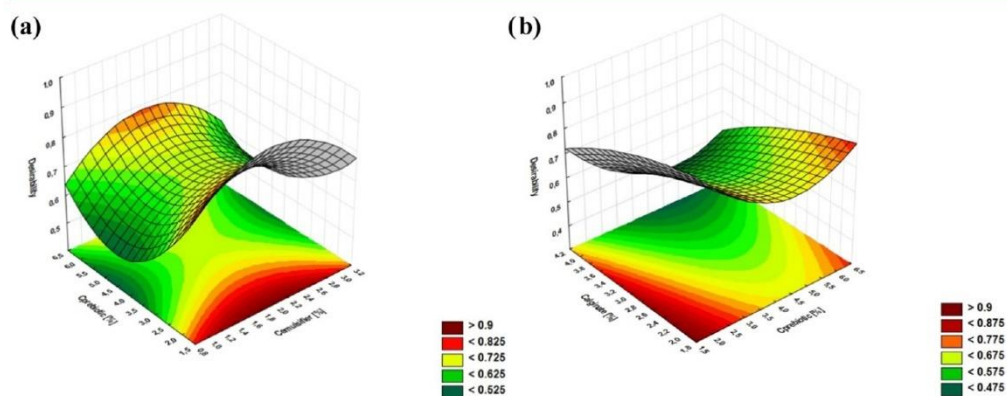


Figure 4. Response surface plots for the desirability with respect to (a) emulsifier and prebiotic concentration and (b) alginate and prebiotic concentration.

Table 3. Input and Output Parameters for the Optimal Composition of Alginate–Prebiotic Microspheres

cemulsifier (%)	cprebiotic (%)	calginate (%)	mass ratio alginate to prebiotic (%)	viscosity (Pa s)	size (μm)	EE after 24 h (log CFU/g)	viability after 7 days (log CFU/g)
1.0	2.0	2.0	1.5	0.530 ± 0.1	30.00 ± 4.25	9.31 ± 0.2	9.06 ± 0.4

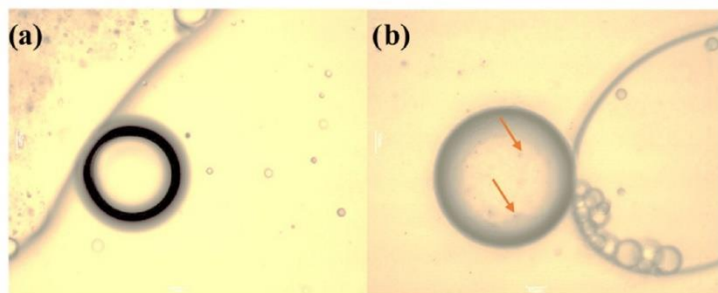


Figure 5. Alginate–prebiotic microspheres containing *L. casei* probiotic before freeze-drying, (a) structure of microsphere, (b) microsphere with encapsulated *L. casei*.

or size of the microparticles (Figure 6b). However, the addition of a prebiotic source had a positive effect on the modification of the surface of the microspheres; consequently, the porous structure was smoothed and the alginate microparticles became more sealed.

The structure of alginate and alginate–prebiotic microspheres with encapsulated *L. casei* is presented in Figure 7. As can be seen, in both cases (Figure 7a,b), microorganisms were present in the sphere (marked with an arrow).

FTIR Analysis. The FTIR spectra of alginate, tapioca flour, and *L. casei*-containing microsphere were used to detect functional groups that may illustrate various interactions between molecules (Figure 8).

A broad peak at approximately 3252 cm^{-1} appears in the plane of the sodium alginate powder, which relates to the O–H stretching vibration. The peak near 1592 cm^{-1} is related to the asymmetric stretching of the $\text{C}=\text{O}$ of the carboxyl group, and the peak near 1405 cm^{-1} is related to the symmetrical stretching of the COO group. The peaks at approximately 1020 cm^{-1} correspond to the hydrogen and C–H bonds, respectively. The vibration absorption bands at $1000\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ arise from the C–H bonds of the monosaccharides.^{38,39}

In the spectrum of tapioca flour, characteristic FTIR absorption peaks were observed, e.g., at 927 , 993 , 1149 , 1335 , and 3287 cm^{-1} . The infrared absorption at approximately 925 cm^{-1} was attributed to glycosidic bonds in starches and asymmetric C–O–C stretching.⁴⁰ The peak at 993 cm^{-1} was associated with the C–OH bending vibration. The absorption peak at 1149 cm^{-1} was probably a result of the C–O and C–C stretching coupling, whereas the peak at 1076 cm^{-1} could be attributed to the C–O–H bending mode. Moreover, the slight peaks between 1149 and 1076 cm^{-1} may be due to the amylopectin content of the starch granules, which depends on the type of starch. In addition, the infrared band at 1335 cm^{-1} may have originated from CH_2 bending. The FTIR spectra of starch show the C–H stretching mode in the range of $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ and the O–H stretching mode in the range of $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$.^{41,42} The O–H stretching mode of starch was observed at 3287 cm^{-1} whereas the C–H stretching mode was approximately 2929 cm^{-1} .

FTIR spectra of alginate–tapioca flour microspheres with entrapped probiotic cells contained slightly shifted, typical polysaccharide vibrational bands with characteristic alginate bands in the regions of 3224 , 1456 , and 1072 cm^{-1} . The spectrum also includes bands typical of tapioca flour: 2934 ,

1632 , and 1072 cm^{-1} . A broad and strong absorption band appears at approximately $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ in both composite materials and is slightly shifted in the microspheres containing probiotic bacteria, suggesting that hydrogen bonds may play an important role in the formation of the biocomposite. The new sharp peak at 1740 cm^{-1} may be related to the amide bonds found in probiotic cellular proteins.¹⁷ The intense bands at 1740 and 1632 cm^{-1} are also associated with amide band I (C=O stretching vibrations) of functional groups from endogenous proteins and amide band II (angle deformation C–N–H in the plane and C–N segment of probiotic cellular proteins).^{17,32} The ATR-FTIR spectrum of probiotic-loaded microspheres contained a peak at $\sim 1072\text{ cm}^{-1}$, which was identified in the literature as stretching vibrations from the phosphoric acid groups in the nucleic acids. Absorption in the range from 1200 to 900 cm^{-1} can be attributed to symmetrical stretching vibrations of the phospho-oxygen (P–O) phosphodioxo group (PO_2^-), as well as deformation vibrations of C–O–C of polysaccharides belonging to the glycoproteins of the cell membrane and lipopolysaccharides of the membrane of probiotic cells.^{32,43} The band at 831 cm^{-1} is in the region of $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$. This region is considered the true fingerprint region because it contains very specific and weak spectral patterns showing the vibrations of the aromatic ring of aromatic amino acids (tryptophan, tyrosine, phenylalanine) and nucleotides.⁴⁴ Absorption in this region is related to the presence of cellular material in the encapsulated probiotic cells.

Coating of Alginate–Prebiotic Microspheres. To encapsulate living cells, a neutral pH is most appropriate, as it does not damage the cellular structures. However, acid-tolerant cultures, such as lactic acid bacteria, can be immobilized in the lower pH range, down to pH 5.^{11,45} Moreover it should be noticed that despite the addition of a prebiotic, the porous structure of microspheres was smoothed and the alginate microparticles were sealed, showing that tapioca flour is the most useful food ingredient for encapsulating prebiotics and stimulating their growth. Therefore, solutions of biopolymers with slightly acidic pH, such as gelatin, chitosan, and hyaluronic acid, were prepared to coat the microspheres and further seal their structure. Table 4 shows the pH of the solutions used to coat the microspheres containing *L. casei* bacteria and the particle size distribution of the resulting microspheres.

The mean diameter of the microspheres without the additional coating layer was $30.1 \pm 2.2\text{ }\mu\text{m}$. The additional coating agents slightly increased the size of the microspheres.

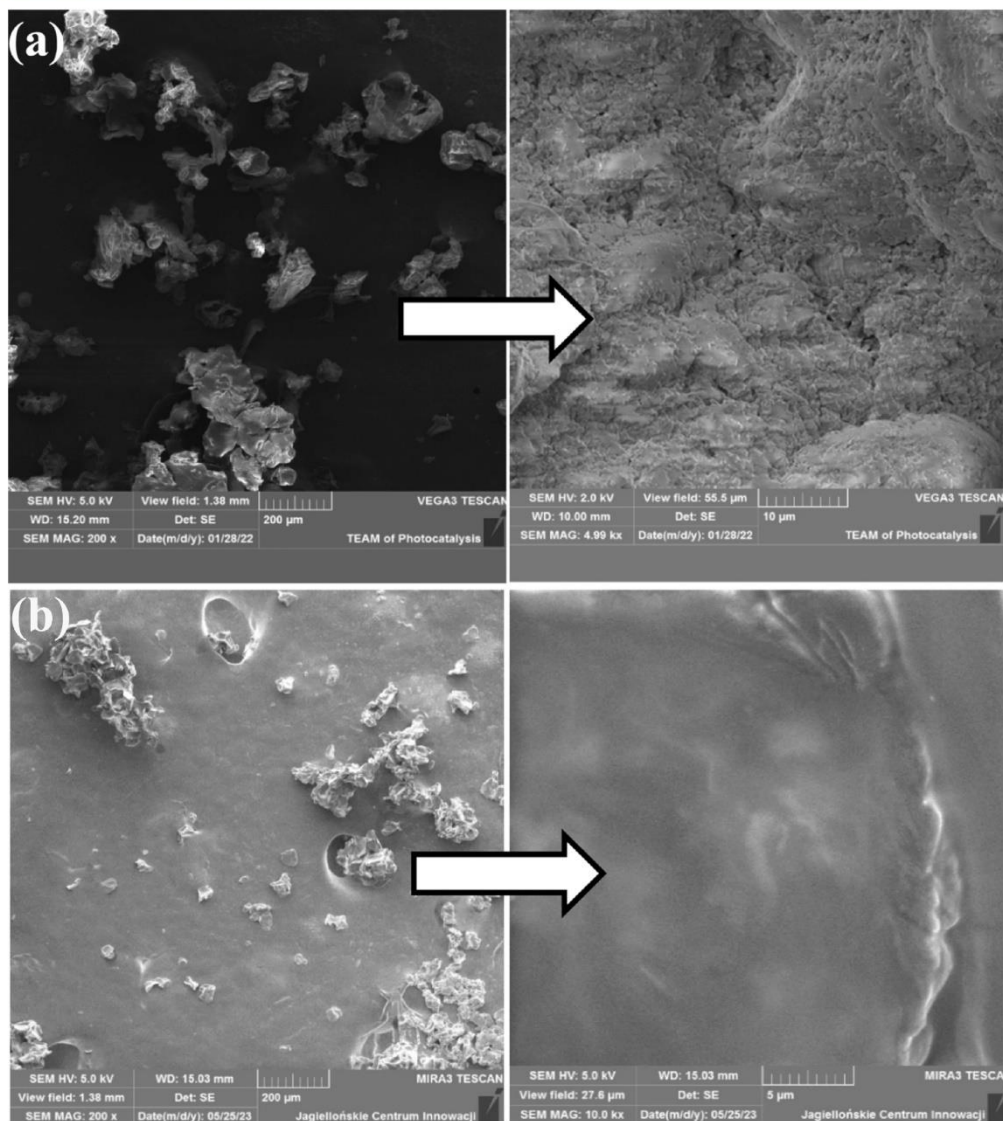


Figure 6. SEM micrographs of cross sections of freeze-dried (a) alginate microspheres (reference sample) and (b) alginate–tapioca flour microspheres.

This is consistent with other literature reports.⁴⁶ In our case, a slight increase in the size of the spheres resulted from the coating. Koo et al.⁴⁷ reported that the shape and size of the beads did not change significantly when chitosan was added as a coating agent to alginate beads. Micron-sized spheres have been prepared in several reports to provide a soft texture when added to other products such as food.^{48,49} In other reports of spheres obtained by the emulsification technique, the sizes are

much larger ($>100\ \mu\text{m}$). The mean diameter of microspheres without additional chitosan coating was $92 \pm 1.709\ \mu\text{m}$ in the study of Zanjani et al.,²¹ whereas that of chitosan-coated microspheres was much larger, at $124 \pm 1.96\ \mu\text{m}$. In our study, the obtained microparticles had a size of less than $40\ \mu\text{m}$, despite the biopolymer coating.

Raman Spectroscopy Analysis. Raman images (usually $50 \times 50\ \mu\text{m}^2$ in size) were collected with a sampling density of

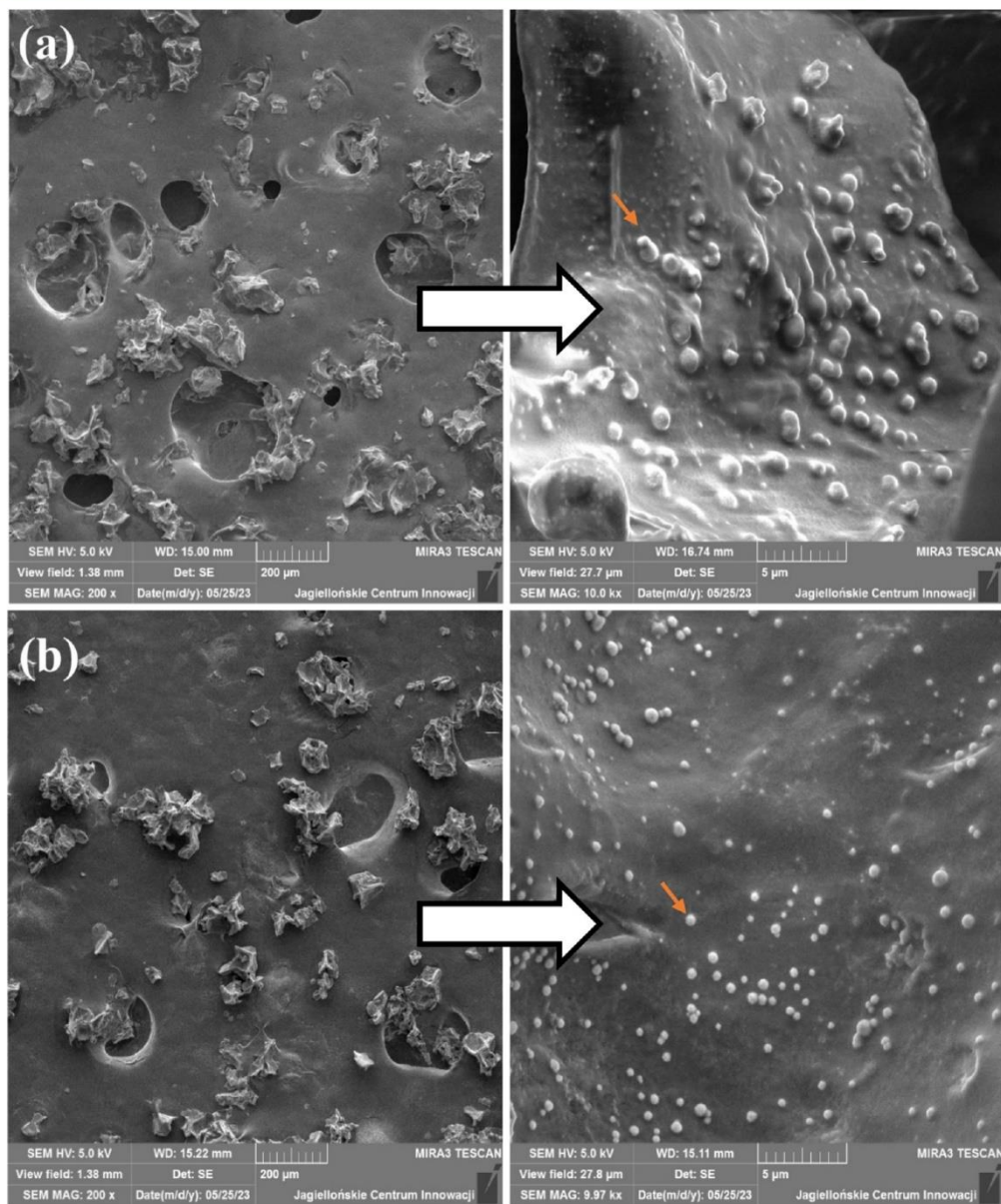


Figure 7. SEM micrographs of the structure of freeze-dried (a) alginate microspheres with encapsulated *L. casei* and (b) alginate–tapioca flour microspheres with encapsulated *L. casei*.

1 μm in the x, y plane and a spectral accumulation time of 0.5 s. Within each sample, Raman images were recorded, which were then subjected to routine processing consisting of removing cosmic rays and correcting the baseline of the

spectra. In the next step, a chemometric analysis (k -means cluster analysis, KMC) was performed to group similar spectra into classes. In the KMC analysis, pixels within the same class were coded with the same color, and the spectra of a given

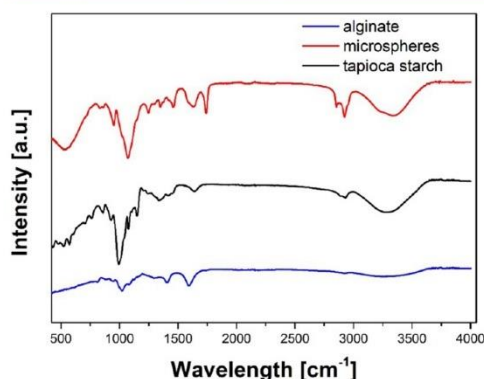


Figure 8. FTIR of plain sodium alginate, plain tapioca flour (prebiotic source), and alginate–prebiotic microspheres with *L. casei*.

Table 4. pH of Coating Solutions and the Particle Size Distribution of Microspheres

coating material	pH	particle size [μm]
uncoated		30.1 ± 2.2
chitosan	5.73	37.5 ± 3.6
gelatin	5.36	32.6 ± 2.1
hyaluronic acid	5.51	34.6 ± 1.6

class were averaged. The background area (outside the microcapsule) is coded in black.

Figure 9 presents the averaged spectra of the standards along with the average spectrum recorded for the sample containing uncoated microspheres. In the average spectrum of uncoated microspheres, there are intense and well-separated bands at positions 1302, 1444, and 1655, and a wide band in the range from 2800 to 3050 cm^{-1} . In the case of standard spectra, marker bands are indicated in Figure 9, which could be used to identify them in the analysis of coated microspheres (as these bands are not present in the spectrum of uncoated microspheres). Hyaluronic acid can be identified based on the bands found at positions 899, 948, and 1375, whereas chitosan is identified mainly on the band at 1375 cm^{-1} . Gelatin is characterized by a set of bands at 1252, 1452, 1671, and 2942 cm^{-1} . Owing to the overlapping of the bands in the so-called “high range” (2800–3050 cm^{-1}) for the spectra of standards and uncoated microspheres, this region was not taken into account during the analysis.

Raman images for coated microspheres were collected for well-isolated objects that were approximately spherical and without visible damage. In the case of all tested microspheres coated with hyaluronic acid (Figure 10), the KMC analysis enabled the separation of two classes within the studied objects, one covering the greater part of the mapped surface containing the central part of the microsphere (colored red) and the other located on the edges (coded in green). The spectrum of the class separated at the edges of the microspheres contains distinct bands at approximately 890, 950, and 1375 cm^{-1} , which may be attributable to hyaluronic acid (they are not present in the spectrum recorded for the sample containing uncoated microspheres). The red class spectrum also contains these bands, but they are less intense,

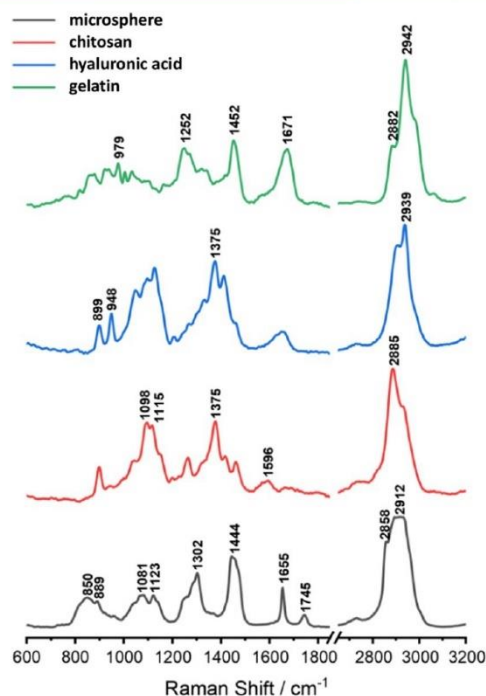


Figure 9. Comparison of the average spectra of standards of hyaluronic acid, chitosan, and gelatin with the average spectrum of uncoated microspheres. The characteristic bands are marked on the spectra of the standards.

which is related to the focal plane and the volume from which the spectrum is collected in each pixel.

Similar results were obtained for chitosan-coated microspheres (Figure 11). In the case of two out of three objects, the chemometric analysis revealed two classes with different spectral profiles: the boundary layer (colored yellow) and the larger-area middle layer (coded in blue). The spectrum of the blue class is similar to the spectrum from the sample containing uncoated microspheres; it is difficult to find bands indicating the presence of chitosan. However, the spectrum of the yellow class (the edge of the microspheres) has a low intensity band located at 1375 cm^{-1} . This band is also present in the chitosan standard spectrum, which may indicate the presence of this compound on the surface of two of three imaged microspheres.

The third sample tested contained gelatin-coated microspheres (Figure 12). In the case of this sample, owing to the high similarity of the spectra recorded within the tested objects, only one class was distinguished based on the KMC analysis. The average spectrum from this class is similar to the spectrum recorded for the sample of uncoated microspheres; there are no visible bands characteristic of the gelatin standard spectrum.

The bacteria (size 1–3 μm) are retained quite well in the alginate gel matrix. However, these microspheres have a porous structure (Figure 6a). The addition of tapioca flour reduces the

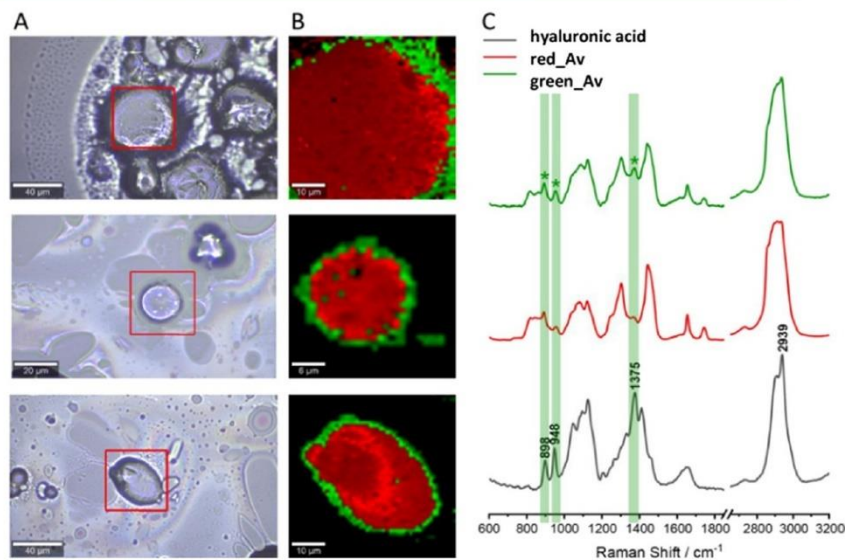


Figure 10. Raman mapping results for selected microspheres coated with hyaluronic acid: images with measurement areas marked (A) with KMC analysis (B) and average spectra for classes (spectral colors correspond to class colors in KMC images) compared with the standard spectrum (C). Bands indicating the presence of hyaluronic acid on the surface of the microspheres are marked as a green area.

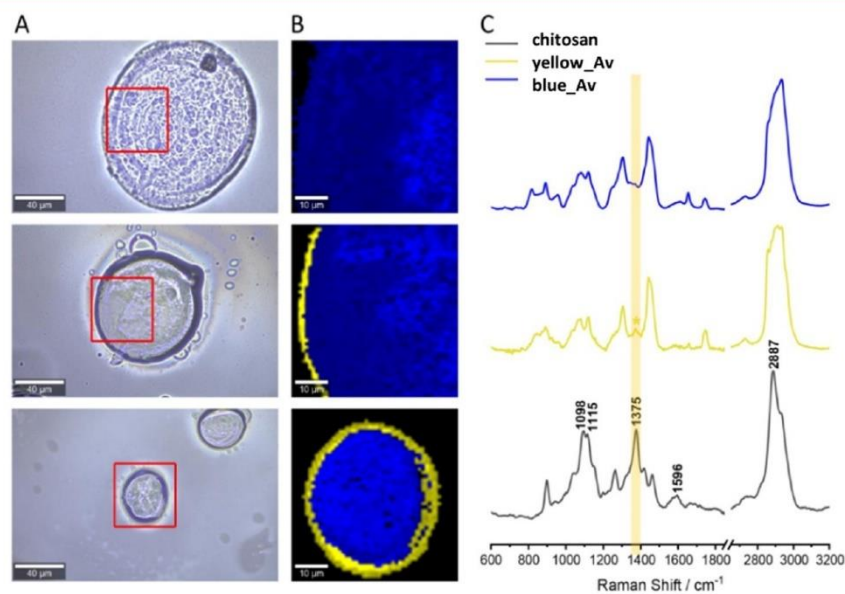


Figure 11. Raman mapping results for selected chitosan-coated microspheres: images with measurement areas marked (A) with KMC analysis (B) and average spectra for the classes (the colors of the spectra correspond to the colors of the classes in the KMC images) compared with the standard spectrum (C). A band indicating the presence of chitosan on the surface of the microspheres is marked in yellow.

pores and smooths the surface of the microspheres (Figure 6b). Conversely, alginate microparticles are susceptible to

disintegration in the presence of excess monovalent ions, Ca^{2+} chelating agents, and harsh chemical environments.⁵⁰ It is

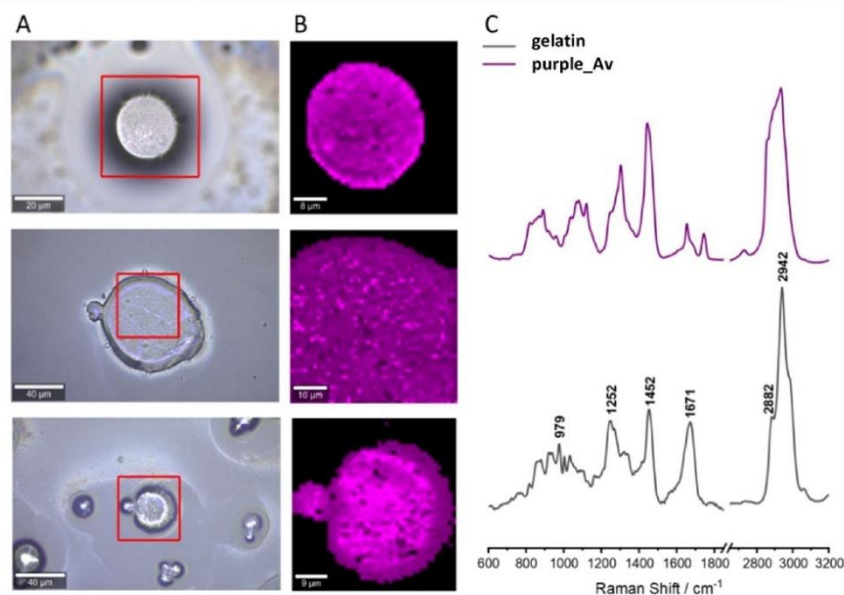


Figure 12. Raman mapping results for selected gelatin-coated microspheres: images with measurement areas marked (A) along with KMC analysis (B) and the average spectrum of the microsphere compared to the gelatin standard (C). In the microspheres spectra, there are no visible bands indicating the presence of gelatin on their surface.

reported that the cross-linked alginate matrix system at low pH reduces the molecular weight of alginate, causing faster degradation and release of active ingredients.²⁰ Therefore, the use of another anionic agent coating the surface of the microspheres (in our case, hyaluronic acid) can prevent the degradation of alginate structures, thereby contributing to the increased stability of the microspheres under the influence of unfavorable conditions. Additionally, the use of tapioca flour may reduce the repulsion between polymers and thus improve the cross-linking of the coated structures.

Coating alginate microspheres with chitosan is well established in the scientific literature. Dropping alginate solution into a solution containing a mixture of calcium chloride and chitosan⁵¹ or soaking alginate beads in this solution⁵² creates chitosan-coated alginate beads, resulting in a polyelectrolyte complex. In the research of Zhou et al.,⁵³ the use of chitosan coating reduced cell release by 40%.

The advantages of gelatin include its ability to form membranes, probiotic biocompatibility, and nontoxicity. Additionally, gelatin and sodium alginate can form a strong complex arising from the electrostatic interactions between the amide group of gelatin and the carboxyl groups of alginate.⁵⁴ However, in the case of gelatin, the effectiveness of the coating cannot be clearly determined. The peaks are at similar lengths with respect to uncoated microspheres, but a second peak is visible at a length of approximately 1671 cm^{-1} . In some reports, gelatin is described with a characteristic peak at 1639 cm^{-1} ,⁵⁵ so the spheres may also be coated with gelatin, but this cannot be confirmed. Additionally, the pH of the coating solution could have influenced the quality of the coating. The isoelectric point of gelatin is approximately 7–9; thus, under neutral pH conditions, it has a positive charge,⁵⁶ and the

coating solution used has a slightly acidic pH, which may also affect the quality of the coating.

Survival of the Encapsulated *L. casei* Strain During Storage. Literature studies indicate that encapsulation of probiotic bacteria leads to significantly higher viability compared with free cells. In the study conducted by Dimitrellou et al.,⁵⁷ the strain *L. casei* ATCC 393 was encapsulated in alginate capsules for the production of probiotic fermented milk. As a result, high bacterial survival (7.13 log CFU g^{-1}) was obtained as a result of storing the product at 4 °C for 4 weeks. The results are in agreement with those of other research groups. Karkar and co-workers⁵⁸ encapsulated the probiotic bacteria *L. casei* and *L. acidophilus* in oleaster flour, which is rich in phenolic compounds and has potential prebiotic properties, and then stored at –24 °C for 28 days. As a result of storage, the viability for *L. casei* bacteria was less than 20%. Similar results were also obtained by Hadzieva et al.⁵⁹ *L. casei* bacteria were encapsulated in a soy protein isolate and sodium alginate. As a result of micro-encapsulation, the survival rate of *L. casei* was 82% during storage for 4 months at 4 °C. However, the survival studies over time were conducted at low temperatures (4 and –24 °C).

Therefore, to increase the survival of probiotic strains at room temperature, in addition to the prebiotic source, additional coating of the spheres can be used.⁶⁰ Such biopolymers include chitosan,^{52,61} poly-L-lysine,^{20,62} gelatin,^{46,55} Eudragit L100-S5,⁶¹ Eudragit S100,⁶³ maltodextrin,⁶⁴ and collagen.⁶⁵ Therefore, we aimed to determine whether the addition of tapioca flour at a concentration of 2% as a source of prebiotic and the use of coating with chitosan, gelatin, or hyaluronic acid significantly affected the survival of the *L. casei*

strain and its viability in spheres during storage at room temperature.

In the first stage of the study, the survival of the *L. casei* strain encapsulated in alginate microspheres (AMs), alginate microspheres enriched with prebiotics (AMPs), and alginate microspheres with prebiotics additionally covered with various substances (APMs chitosan, APMs gelatin, APMs hyaluronic acid) was assessed. Survival was assessed immediately after capsule production and after 7 and 30 days of storage, and the results obtained were expressed as log CFU g⁻¹ (Figure 13).

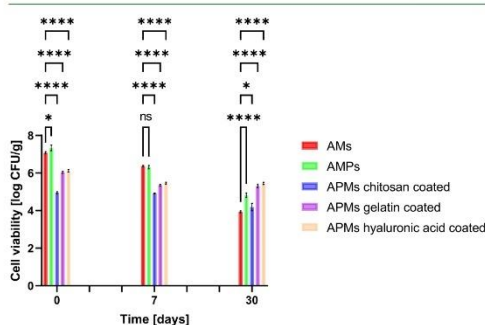


Figure 13. Comparison of the viability of encapsulated *L. casei* in alginate microspheres (reference sample), alginate–prebiotic microspheres (AMPs), and APMs coated with chitosan, gelatin, and hyaluronic acid during 30 days of storage at room temperature. **p* = 0.05–0.011; ***p* ≤ 0.01; ****p* ≤ 0.001; *****p* ≤ 0.0001.

The initial density of the *L. casei* strain suspension used to obtain spheres was 8.1 log CFU g⁻¹. Immediately after receiving the spheres, the highest survival of the *L. casei* strain was observed for APMs and AMs spheres, of 7.31 and 7.01 log CFU g⁻¹, respectively. Slightly lower survival values were observed for APMs spheres coated with other substances: 4.97 log CFU g⁻¹ (APMs chitosan coated), 6.11 log CFU g⁻¹ (APMs gelatin coated), and 6.05 log CFU g⁻¹ (APMs hyaluronic acid coated).

After 7 days of storage at room temperature, the survival rate of the probiotic strain decreased to 6.32 log CFU g⁻¹ in APMs spheres and 6.22 log CFU g⁻¹ in AMs spheres. For the remaining spheres, the survival rates of *L. casei* were 4.41 log CFU g⁻¹ (APMs chitosan coated), 5.37 log CFU g⁻¹ (APMs gelatin coated), and 5.27 log CFU g⁻¹ (APMs hyaluronic acid coated).

After 1 month of storage, a significant change in the survival of the *L. casei* strain was compared with the results of fresh spheres and after 7 days of storage. The highest survival rate of the probiotic strain was recorded for APMs hyaluronic acid-coated spheres, of 5.48 log CFU g⁻¹. Slightly lower strain survival was found in APMs gelatin-coated spheres of 5.34 log CFU g⁻¹. In the case of the remaining spheres, the obtained survival values were as follows: 3.99 log CFU g⁻¹ (AMs), 4.84 log CFU g⁻¹, and 4.94 log CFU g⁻¹ (APMs chitosan coated).

We also assessed how the percentage viability of the strain encapsulated changed after 7 and 30 days of storage compared to the viability immediately after sphere production (100% viability) (Figure 14).

After 7 days of storage, the highest viability of the *L. casei* strain was found in the case of APMs chitosan coated, APMs

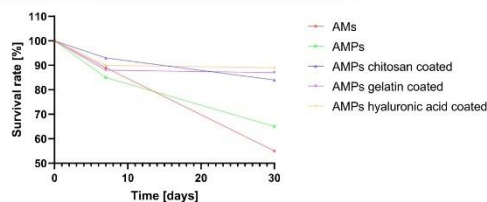


Figure 14. Survival rates of *L. casei* in AMs, AMPs, APMs chitosan-, gelatin-, and hyaluronic acid-coated microspheres over 30 days of storage at room temperature.

hyaluronic acid coated, and AMs spheres, with values of 93.8, 90.4, and 89.9%, respectively. The viability of the strain in other spheres was slightly lower (88.6% for APMs gelatin-coated spheres and 86% for AMPs spheres).

Extending the storage period to 30 days resulted in a 10.96% reduction in the viability of the *L. casei* strain in the case of APMs hyaluronic acid-coated spheres and a 12.1% reduction in the case of APMs gelatin-coated spheres compared with the initial value. In the remaining spheres, a much higher reduction in survival values was found: 16.81% (APMs chitosan coated), 34.4% (AMPs), and 44.4% (AMs).

The obtained results therefore indicate that the addition of a prebiotic and the coating of microspheres with gelatin and hyaluronic acid significantly affected the survival rate (survival rate of 5.48–5.34 log CFU g⁻¹) as well as maintaining the viability of the probiotic strain (viability rate of 89–87.9%) during long-term storage. The effect of chitosan was slightly less effective than hyaluronic acid or gelatin. The obtained strain survival results for chitosan-coated spheres after 1 month of storage were similar to those for prebiotic spheres (survival of 4.84–4.94 log CFU g⁻¹). The use of chitosan coating allowed the viability of *L. casei* to be maintained at 83.2%; for probiotic spheres, this value was 65.6%.

The effectiveness of gelatin coating was already reported by da Conceição et al.⁵⁴ They encapsulated two probiotic strains of *Lactobacillus paracasei* (LBC 81 and ELBAL) with fructooligosaccharides (FOS) as a prebiotic in a calcium alginate matrix using extrusion technology with gelatin as a coating material. Both strains were characterized by high viability under the tested stress conditions, such as a simulated gastrointestinal environment and low-temperature storage. Previous research has also shown that an alginate matrix coated with gelatin can improve the survival of probiotic bacteria in unfavorable conditions.^{66,67}

Several studies have shown that low-molecular-weight chitosan is effective as a microcapsule coating agent despite its antimicrobial properties.^{68,69}

The research of Erdélyi et al.⁶¹ into the development of a probiotic preparation for animals in the form of chitosan-coated microspheres containing strains of the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* showed lower resistance to stress conditions (heat) and lower viability of the strains compared with uncoated microspheres. Our research has shown that coating microspheres with chitosan can increase the viability of the *L. casei* strain without significantly affecting its survival over 30 days of storage. It should therefore be noted that encapsulating different strains of bacteria can present different behaviors.⁷⁰ Coating alginate beads with chitosan has been found to create a complexation between the

two materials, resulting in important properties such as reduced porosity, decreased encapsulated bacteria leakage, and high stability across varying pH ranges. This is because the negatively charged alginate interacts with the positively charged chitosan, forming a semipermeable membrane.⁷¹

According to available literature data, no work has examined the use of hyaluronic acid to coat AMs containing probiotic bacteria. However, hyaluronic acid has been used as a substance for coencapsulation of AMs for potential use as vehicles for drug delivery to the lungs.^{39,72} In the study by Ratanavarapom et al.,⁵⁶ the use of hybrid alginate/hyaluronic acid spheres as a carrier for gentamicin was also described, which resulted in sustained release of the antibiotic. Moreover, in the work of Cañibano-Hernández et al.,⁷³ hybrid alginate–hyaluronic acid microspheres were used to encapsulate insulin-producing cells. According to their study, the inclusion of hyaluronic acid in AMs resulted in an increase in the viability of insulin-producing pancreatic islet cells, reducing the percentage of cells displaying early apoptosis and membrane damage. The studies presented in this article showed that hyaluronic acid has the greatest impact (89%) on improving the viability of *L. casei* during storage.

The differences in the survival and viability of probiotic bacteria in microspheres coated with hyaluronic acid, gelatin, and chitosan may result from the antibacterial properties of chitosan. Chitosan and chitosan derivatives have a killing effect on various species of microorganisms by neutralizing the negative charges on their surface.^{4,75} According to No,⁷⁵ MIC values of chitosan with molecular weights in the range from 224 to 28 kDa for three strains of probiotic bacteria of the *Lactobacillus* genus were as follows: *L. plantarum* (0.05–0.05%), *Lactobacillus brevis* (>0.1–0.08%), and *Lactobacillus bulgaricus* (0.1–0.1%).

CONCLUSIONS

In this study, alginate–tapioca flour microspheres coated with different biopolymers, such as hyaluronic acid, chitosan, and gelatin, were obtained. The use of microencapsulation techniques, such as emulsification, obtained microcarriers that were smaller than 40 μm in size. The addition of prebiotics and biopolymer coating of the microspheres, especially with hyaluronic acid and chitosan, made their structure more smooth and sealed, which strongly affected the survival and viability of the encapsulated probiotic strain (*L. casei* bacteria) during long-term storage. The highest survival rate of the probiotic strain was recorded for alginate–tapioca flour microspheres covered with hyaluronic acid and maintained the viability of *L. casei* at 89% during storage for 30 days compared with a value of 65.6% for uncoated probiotic spheres. Considering these promising results, microcarriers of live bacteria are significant for use in cosmetic products. The use of probiotics in topical preparations can be an alternative or supplement for skin affected by inflammation, including atopic dermatitis or dry or sensitive skin. Restoring the balance of the bacterial microflora of the skin will translate into the proper functioning of the skin barrier and the reduction of inflammation related to the disruption of skin barrier integrity and the multiplication of pathogenic bacteria. Therefore, further *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to confirm the potential benefits for the skin.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Anna Łętocha – Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Cracow, Poland; orcid.org/0000-0001-6320-7656; Email: anna.letocha@doktorant.pk.edu.pl

Authors

Alicja Michalczyk – Lukaszewicz Research Network—Institute of Industrial Organic Chemistry, 03-236 Warsaw, Poland

Malgorzata Miastkowska – Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Cracow, Poland

Elżbieta Sikora – Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Cracow, Poland

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acsami.4c10187>

Author Contributions

A.Ł.: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization. A.M.: Methodology, investigation, writing—original draft preparation. M.M.: Writing—original draft preparation, writing—review and editing, supervision. E.S.: Resources, supervision.

Funding

This research received no external funding.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Łętocha, A.; Sikora, E. In *Pre- and Probiotics as Raw Materials for Cosmetic Products*, EYEC Monograph: 9th European Young Engineers Conference, 2021, pp 47–51.
- (2) Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11* (8), S06–S14.
- (3) Ouwehand, A. C.; Lahtinen, S.; Tiihonen, K. The Potential of Probiotics and Prebiotics for Skin Health. In *Textbook of Aging Skin*; Farage, M., et al., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2017; pp 1299–1313.
- (4) Biswas, N.; Sahoo, R. K. Tapioca Starch Blended Alginate Mucoadhesive-Floating Beads for Intragastric Delivery of Metoprolol Tartrate. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *83*, 61–70.
- (5) Jafari, S. M.; Assadpoor, E.; Bhandari, B.; He, Y. Nano-Particle Encapsulation of Fish Oil by Spray Drying. *Food Res. Int.* **2008**, *41* (2), 172–183.
- (6) Lokuwan, J. Characteristics of Microencapsulated β -Carotene Formed by Spray Drying with Modified Tapioca Starch, Native Tapioca Starch and Maltodextrin. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21* (5–6), 928–935.
- (7) Illum, L.; Fisher, A. N.; Jabbal-Gill, I.; Davis, S. S. Bioadhesive Starch Microspheres and Absorption Enhancing Agents Act Synergistically to Enhance the Nasal Absorption of Polypeptides. *Int. J. Pharm.* **2001**, *222* (1), 109–119.
- (8) Stertman, L.; Lundgren, E.; Sjöholm, I. Starch Microparticles as a Vaccine Adjuvant: Only Uptake in Peyer's Patches Decides the Profile of the Immune Response. *Vaccine* **2006**, *24* (17), 3661–3668.
- (9) Zhu, F. Composition, Structure, Physicochemical Properties, and Modifications of Cassava Starch. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *122*, 456–480.

- (10) Hsieh, C. F.; Liu, W.; Whaley, J. K.; Shi, Y. C. Structure, Properties, and Potential Applications of Waxy Tapioca Starches – A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *83*, 225–234.
- (11) Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers* **2022**, *14* (18), No. 3834.
- (12) Sikora, E.; Miastkowska, M.; Lason, E. *Selected Skin Delivery Systems*; Wydawnictwo PK: Kraków, 2020.
- (13) Łętocha, A.; Michalczyk, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Design of Alginate Microspheres Formulation as a Probiotics Carrier. *Chem. Process Eng.: New Front.* **2023**, *44* (2), 1–13.
- (14) Mekadim, C.; Skalnikova, H. K.; Cizkova, J.; Cizkova, V.; Palanova, A.; Horak, V.; Mrazek, J. Dysbiosis of Skin Microbiome and Gut Microbiome in Melanoma Progression. *BMC Microbiol.* **2022**, *22* (1), No. 63.
- (15) Łętocha, A. Probiotyczne Surowce Jako Składniki Aktywne Formułacji Kosmetycznych. *Przem. Chem.* **2022**, *1* (9), 81–85.
- (16) Paques, J. P. *Formation of Alginate Nanospheres*; Wageningen University, 2014.
- (17) Arenales-Sierra, I. M.; Lobato-Calleros, C.; Vernon-Carter, E. J.; Hernández-Rodríguez, L.; Alvarez-Ramirez, J. Calcium Alginate Beads Loaded with Mg(OH)₂ Improve *L. casei* Viability under Simulated Gastric Condition. *LWT* **2019**, *112*, No. 108220.
- (18) Shafizadeh, A.; Golestan, L.; Ahmadi, M.; Darjani, P.; Ghorbani, A. Encapsulation of *Lactobacillus casei* in Alginate Microcapsules: Improvement of the Bacterial Viability under Simulated Gastrointestinal Conditions Using Flaxseed Mucilage. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14* (4), 1901–1908.
- (19) Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Sposób Otrzymywania Mikroksupulek Zawierających Bakterie Probiotyczne. Patent 443812, 2023.
- (20) Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. The Influence of Coating Materials on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Int. Dairy J.* **2004**, *14* (8), 737–743.
- (21) Zanjani, M. A. K.; Tarzi, B. G.; Sharifan, A.; Mohammadi, N. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-Gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-Intestinal Condition. *Iran. J. Pharm. Res.* **2014**, *13* (3), 843–852.
- (22) Mao, Y.; Chen, X.; Xu, B.; Shen, Y.; Ye, Z.; Chaurasiya, B.; Liu, L.; Li, Y.; Xing, X.; Chen, D. Eprinomectin Nanoemulgel for Transdermal Delivery against Endoparasites and Ectoparasites: Preparation, in Vitro and in Vivo Evaluation. *Drug Delivery* **2019**, *26* (1), 1104–1114.
- (23) Al-Abboodi, A.; Zhang, S.; Al-Saady, M.; Ong, J. W.; Chan, P. P. Y.; Fu, J. Printing in Situ Tissue Sealant with Visible-Light-Crosslinked Porous Hydrogel. *Biomed. Mater.* **2019**, *14* (4), No. 045010.
- (24) Miastkowska, M.; Kulawik-Pióro, A.; Szczurek, M. Nano-emulsion Gel Formulation Optimization for Burn Wounds: Analysis of Rheological and Sensory Properties. *Processes* **2020**, *8* (11), No. 1416.
- (25) Darjani, P.; Nezhad, H. M.; Kadkhodaei, R.; Milani, E. Influence of Probiotic and Coating Materials on Morphology and Survival of a Probiotic Strain of *Lactobacillus casei* Exposed to Simulated Gastrointestinal Conditions. *LWT* **2016**, *73*, 162–167.
- (26) Bustamante, M.; Villarreal, M.; Rubilar, M.; Shene, C. *Lactobacillus acidophilus* La-05 Encapsulated by Spray Drying: Effect of Mucilage and Protein from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *LWT—Food Sci. Technol.* **2015**, *62* (2), 1162–1168.
- (27) Roozen, M.; Serventi, L. Ingredients from Climate Resilient Crops to Enhance the Nutritional Quality of Gluten-Free Bread. *Food* **2022**, *11*, No. 1628.
- (28) Onet, N. B. *Production of Lactic Acid from Tapioca Sugars*; Universiti Malaysia Sarawak, 2012.
- (29) Shamala, T. R.; Sreekantiah, K. R. Fermentation of Starch Hydrolysates by *Lactobacillus plantarum*. *J. Ind. Microbiol.* **1988**, *3* (3), 175–178.
- (30) Gänzle, M. G.; Follador, R. Metabolism of Oligosaccharides and Starch in *Lactobacilli*: A Review. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–15.
- (31) Luca, L.; Oroian, M. The Impact of Potential Prebiotics Inulin, Oligofructose and Potato Starch on the Growth of *Lactobacillus casei*. *AgroLife Sci. J.* **2019**, *8* (1), 153–159.
- (32) Lasta, E. L.; da Silva Pereira Ronning, E.; Dekker, R. F. H.; da Cunha, M. A. A. Encapsulation and Dispersion of *Lactobacillus acidophilus* in a Chocolate Coating as a Strategy for Maintaining Cell Viability in Cereal Bars. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), No. 20550.
- (33) Bassani, J. C.; Queiroz Santos, V. A.; Barbosa-Dekker, A. M.; Dekker, R. F. H.; da Cunha, M. A. A.; Pereira, E. A. Microbial Cell Encapsulation as a Strategy for the Maintenance of Stock Cultures. *LWT* **2019**, *102*, 411–417.
- (34) Kwok, K. K.; Groves, M. J.; Burgess, D. J. Production of 5–15 Mm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique. *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 341–344.
- (35) Poletto, G.; Fonseca, B. d. S.; Raddatz, G. C.; Wagner, R.; Lopes, E. J.; Barin, J. S.; Flores, E. M. d. M.; Menezes, C. R. d. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and Different Prebiotic Agents by External Ionic Gelation Followed by Freeze-Drying. *Cienc. Rural* **2019**, *49* (2), 1–7.
- (36) Dolly, P.; Anishparvin, A.; Joseph, G. S.; Anandharamakrishnan, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (Mtcc 5422) by Spray-Freeze-Drying Method and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *J. Microencapsul.* **2011**, *28* (6), 568–574.
- (37) Fareez, I. M.; Lim, S. M.; Mishra, R. K.; Ramasamy, K. Chitosan Coated Alginate-Xanthan Gum Bead Enhanced PH and Thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1419–1428.
- (38) Dehkordi, S. S.; Alemzadeh, I.; Vaziri, A. S.; Vossoughi, A. Optimization of Alginate-Whey Protein Isolate Microcapsules for Survivability and Release Behavior of Probiotic Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *190* (1), 182–196.
- (39) Athamneh, T.; Amin, A.; Benke, E.; Ambrus, R.; Leopold, C. S.; Gurikov, P.; Smirnova, I. Alginate and Hybrid Alginate-Hyaluronic Acid Aerogel Microspheres as Potential Carrier for Pulmonary Drug Delivery. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *150*, 49–55.
- (40) Zhang, K.; Zhang, Z.; Zhao, M.; Milosavljevic, V.; Cullen, P.; Scally, L.; Sun, D.-W.; Tiwari, B. Low-Pressure Plasma Modification of the Rheological Properties of Tapioca Starch. *Food Hydrocolloids* **2022**, *125*, No. 107380.
- (41) Ayu, R. S.; Khalina, A.; Harmaen, A. S.; Zaman, K.; Jawaid, M.; Lee, C. H. Effect of Modified Tapioca Starch on Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of PBS Blends for Food Packaging. *Polymers* **2018**, *10* (11), No. 1187.
- (42) Deeyai, P.; Suphantharika, M.; Wongsagonsup, R.; Dangtip, S. Characterization of Modified Tapioca Starch in Atmospheric Argon Plasma under Diverse Humidity by FTIR Spectroscopy. *Chin. Phys. Lett.* **2013**, *30* (1), No. 018103.
- (43) Rather, S. A.; Akhter, R.; Masoodi, F. A.; Gani, A.; Wani, S. M. Effect of Double Alginate Microencapsulation on in Vitro Digestibility and Thermal Tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT—Food Sci. Technol.* **2017**, *83*, 50–58.
- (44) Alvarez-Ordóñez, A.; Mouwen, D. J. M.; López, M.; Prieto, M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool to Characterize Molecular Composition and Stress Response in Foodborne Pathogenic Bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *84* (3), 369–378.
- (45) Poncelet, D. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2001**, *944* (1), 74–82.
- (46) Annan, N. T.; Borza, A. D.; Hansen, L. T. Encapsulation in Alginate-Coated Gelatin Microspheres Improves Survival of the Probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during Exposure to Simulated Gastro-Intestinal Conditions. *Food Res. Int.* **2008**, *41* (2), 184–193.
- (47) Koo, S. M.; Cho, Y. H.; Huh, C. S.; Baek, Y. J.; Park, J. Improvement of the Stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by Microencapsulation Using Alginate and Chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 376–383.

- (48) Maryam, F.; Nima, M.; Hamed, A.; Mohammad, A. Z.; Fariba, Z. H.; Kasra, B. Effect of Microencapsulation plus Resistant Starch on Survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in Mayonnaise Sauce. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6* (40), 6853–6858.
- (49) Zanjani, M. A. K.; Tarzi, B. G.; Sharifan, A.; Mohammadi, N.; Bakhoda, H.; Madanipour, M. M. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with Calcium Alginate-Resistant Starch and Evaluation of Survival and Sensory Properties in Cream-Filled Cake. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6* (26), 5511–5517.
- (50) Smidsrod, O.; Haug, A.; Lian, B.; et al. Properties of Poly(1,4-Hexuronates) in the Gel State. I. Evaluation of a Method for the Determination of Stiffness. *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 71–78.
- (51) Overgaard, S.; Schärer, J. M.; Moo-Young, M.; Bols, N. C. Immobilization of Hybridoma Cells in Chitosan Alginate Beads. *Can. J. Chem. Eng.* **1991**, *69* (4), 439–443.
- (52) Jantarathin, S.; Borompichaichartkul, C.; Sanguandekul, R. Microencapsulation of Probiotic and Prebiotic in Alginate-Chitosan Capsules and Its Effect on Viability under Heat Process in Shrimp Feeding. *Mater. Today Proc.* **2017**, *4* (5), 6166–6172.
- (53) Zhou, Y.; Martins, E.; Groboillot, A.; Champagne, C. P.; Neufeld, R. J. Spectrophotometric Quantification of Lactic Bacteria in Alginate and Control of Cell Release with Chitosan Coating. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84* (3), 342–348.
- (54) da Conceição, R. C. N.; Batista, R. D.; Leal Zimmer, F. M. d. A.; Trindade, I. K. M.; de Almeida, A. F.; Santos, C. C. A. d. A. Effect of Co-Encapsulation Using a Calcium Alginate Matrix and Fructooligosaccharides with Gelatin Coating on the Survival of *Lactobacillus paracasei* Cells. *Braz. J. Microbiol.* **2021**, *52* (3), 1503–1512.
- (55) Lopes, S.; Bueno, L.; De Aguiar Júnior, F.; Finkler, C. L. L. Preparation and Characterization of Alginate and Gelatin Microcapsules Containing *Lactobacillus rhamnosus*. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89* (3), 1601–1613.
- (56) Ratanavaraporn, J.; Chuma, N.; Kanokpanont, S.; Damrongsakkul, S. Beads Fabricated from Alginate, Hyaluronic Acid, and Gelatin Using Ionic Crosslinking and Layer-by-Layer Coating Techniques for Controlled Release of Gentamicin. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136* (1), No. 46893.
- (57) Dimitrellou, D.; Kandyli, P.; Lević, S.; Petrović, T.; Ivanović, S.; Nedović, V.; Kourkoutas, Y. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in Alginate Capsules for Probiotic Fermented Milk Production. *LWT* **2019**, *116*, No. 108501.
- (58) Karkar, B.; Şahin, S.; Yilmaz-Ersan, L.; Akça, B.; Güneş, M. E.; Özakın, C. Encapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Using *Elaeagnus angustifolia* L. Flour as Encapsulating Material by Emulsion Method. *Food Sci. Nutr.* **2024**, 1–16.
- (59) Hadzieva, J.; Mladenovska, K.; Crcarevska, M. S.; Dodov, M. G.; Dimchevska, S.; Geškovski, N.; Grozdanov, A.; Popovski, E.; Petruševski, G.; Chachorovska, M.; Ivanovska, T. P.; Petruševska-Tozi, L.; Ugarkovic, S.; Goracinova, K. *Lactobacillus casei* Encapsulated in Soy Protein Isolate and Alginate Microparticles Prepared by Spray Drying. *Food Technol. Biotechnol.* **2017**, *55* (2), 173–186.
- (60) Cook, M. T.; Tzortzis, G.; Charalampopoulos, D.; Khutoryanskiy, V. V. Microencapsulation of Probiotics for Gastrointestinal Delivery. *J. Controlled Release* **2012**, *162* (1), 56–67.
- (61) Erdélyi, L.; Fenyvesi, F.; Gál, B.; Haimhoffer, A.; Vasvári, G.; Budai, I.; Remenyik, J.; Bereczki, L.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Bácskay, L.; Vecsernyés, M.; Kovács, R.; Váradi, J. Investigation of the Role and Effectiveness of Chitosan Coating on Probiotic Microcapsules. *Polymers* **2022**, *14* (9), No. 1664.
- (62) Baldwin, E. T.; Wells, L. A. Hyaluronic Acid and Poly-L-Lysine Layers on Calcium Alginate Microspheres to Modulate the Release of Encapsulated FITC-Dextran. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110* (6), 2472–2478.
- (63) Akanny, E.; Bourgeois, S.; Bonhomme, A.; Commun, C.; Doleans-Jordheim, A.; Bessueille, F.; Bordes, C. Development of Enteric Polymer-Based Microspheres by Spray-Drying for Colonic Delivery of *Lactobacillus Rhamnosus* GG. *Int. J. Pharm.* **2020**, *584*, No. 119414.
- (64) Sohail, A.; Turner, M. S.; Coombes, A.; Bhandari, B. The Viability of *Lactobacillus Rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 2763–2769.
- (65) Yao, R.; Alkhawani, A. Y. F.; Chen, R.; Luan, J.; Xu, M. Rapid and Efficient in Vivo Angiogenesis Directed by Electro-Assisted Bioprinting of Alginate/Collagen Microspheres with Human Umbilical Vein Endothelial Cell Coating Layer. *Int. J. Bioprint.* **2019**, *5* (2 special issue 2.1), 3–14.
- (66) Etchepare, M. d. A.; Barin, J. S.; Cichoski, A. J.; Jacob-Lopes, E.; Wagner, R.; Fries, L. L. M.; de Menezes, C. R. Microencapsulação de Probióticos Utilizando Alginato de Sódio. *Cienc. Rural* **2015**, *45* (7), 1319–1326.
- (67) Trabelsi, I.; Ayadi, D.; Bejar, W.; Bejar, S.; Chouayekh, H.; Ben Salah, R. Effects of *Lactobacillus plantarum* Immobilization in Alginate Coated with Chitosan and Gelatin on Antibacterial Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 84–89.
- (68) Cheow, W. S.; Hadinoto, K. Biofilm-like *Lactobacillus rhamnosus* Probiotics Encapsulated in Alginate and Carrageenan Microcapsules Exhibiting Enhanced Thermotolerance and Freeze-Drying Resistance. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (9), 3214–3222.
- (69) Jiang, T.; Kim, Y. K.; Singh, B.; Kang, S. K.; Choi, Y. J.; Cho, C. S. Effect of Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 25 into Alginate/Chitosan/Alginate Microcapsules on Viability and Cytokine Induction. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13* (8), S291–S295.
- (70) Morales, M. E.; Ruiz, M. A. *Microencapsulation of Probiotic Cells: Applications in Nutraceutical and Food Industry*; Elsevier Inc., 2016.
- (71) Chávarri, M.; Marañón, I.; Ares, R.; Ibáñez, F. C.; Marzo, F.; Villarín, M. d. C. Microencapsulation of a Probiotic and Prebiotic in Alginate-Chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142* (1–2), 185–189.
- (72) Athamneh, T.; Amin, A.; Benke, E.; Ambrus, R.; Gurikov, P.; Smirnova, I.; Leopold, C. S. Pulmonary Drug Delivery with Aerogels: Engineering of Alginate and Alginate-Hyaluronic Acid Microspheres. *Pharm. Dev. Technol.* **2021**, *26* (S), S09–S21.
- (73) Cañibano-Hernández, A.; Saenz del Burgo, L.; Espona-Noguera, A.; Orive, G.; Hernández, R. M.; Ciriza, J.; Pedraz, J. L. Hyaluronic Acid Enhances Cell Survival of Encapsulated Insulin-Producing Cells in Alginate-Based Microcapsules. *Int. J. Pharm.* **2019**, *557*, 192–198.
- (74) Yan, D.; Li, Y.; Liu, Y.; Li, N.; Zhang, X.; Yan, C. Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules* **2021**, *26* (23), No. 7136.
- (75) No, H. K.; Young Park, N.; Ho Lee, S.; Meyers, S. P. Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74* (1–2), 65–72.

[6C]



(10) **PL 246674 B1**

(12)

Opis patentowy

- (21) Numer zgłoszenia: **443812**
(22) Data zgłoszenia: **2023.02.16**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.07.17 BUP 29/2023**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.24 WUP 08/2025**

- (51) MKP:
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01)
A61K 8/11 (2006.01)
A61K 8/99 (2017.01)
B01J 13/02 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A23P 10/35 (2016.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

	(73) Uprawniony z patentu: POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA KOŚCIUSZKI, Kraków, PL (72) Twórca(-y) wynalazku: ANNA ŁĘTOCHA, Wiśniowa, PL MAŁGORZATA MIASTKOWSKA, Kraków, PL ELŻBIETA SIKORA, Kraków, PL (74) Pełnomocnik: rzecz. pat. Lilianna Krawczyk, Tarnów, PL
--	--

- (54) Tytuł:
Sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne

PL 246674 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne zamknięte wewnątrz kapsułki wytworzonej z naturalnego polimeru na przykład alginianu z alg brunatnych.

Mikrokapsułkowanie, czy też mikroenkapsulacja, jest procesem polegającym na powlekaniu lub zamykaniu danego materiału lub mieszaniny materiałów wewnątrz otoczki (membrany), którą stanowi określony materiał lub układ. Zazwyczaj materiały te różnią się właściwościami fizyko-chemicznymi, to też w wyniku mikroenkapsulacji otrzymywany jest produkt kompozytowy – mikrokapsułka, złożone z rdzenia oraz otoczki o różnej charakterystyce materiałowej. Istnieje wiele metod mikroenkapsulacji, które można podzielić na dwie główne grupy: procesy chemiczne (np. koacerwacja, polimeryzacja międzyczasowa lub in situ) oraz procesy mechaniczne lub fizyczne (np. suszenie rozpyłowe, enkapsulacja mikroprzepływowa, wytłaczanie wirowe, technologia wibracji dysz).

Najczęściej stosowanymi w enkapsulacji biomateriałami są resorbowalne materiały polimerowe naturalne i syntetyczne, wśród których wyróżnić należy dwie grupy: polisacharydy, w tym alginian, chitozan; oraz poliestry alifatyczne, takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer polilaktyd-glikolid (PLGA). Mikrokapsułki alginianowe stanowią biokompatybilne, biodegradowalne i nietoksyczne systemy dostarczania substancji aktywnych. Surowcem stosowanym do otrzymywania mikrosfer są alginiany, polisacharydy pozyskiwane z alg morskich, zbudowane z połączonych wiązaniem glikozydowym cząsteczek kwasu D-mannuronowego i kwasu L-guluronowego. Ze względu na biokompatybilność i nietoksyczność alginiany znalazły zastosowanie, jako nośniki substancji aktywnych, przy czym wykorzystywane są w formie mikrożeli, mikrokapsulek i mikrosfer. Najczęściej stosowane są w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Do popularnych metod otrzymywania kapsulek alginianowych należą techniki takie jak: ekstruzja (wytłaczanie), emulsyfikacja oraz suszenie rozpyłowe.

W stanie techniki znane jest rozwiązanie będące przedmiotem zgłoszenia patentowego **P.395685**, które dotyczy sposobu wytwarzania mikrokapsulek żelowych i charakteryzuje się tym, że do komory wprowadzane są równocześnie i rozpylane na siebie co najmniej dwa strumienie gazozoli, z których jeden stanowi mieszaninę żelującego składnika będącego ścianką mikrokapsułki i substancji zamkniętej, a drugi zawiera substancję wchodzącą w reakcję utwardzania – żelowania ścianki mikrokapsułki, przy czym wielkość cząstek faz rozproszonych w gazie nie może być większa niż 100 µm.

Z amerykańskiego zgłoszenia patentowego **US 2009/0098628** również jako EP1702058B1 znana jest metoda i urządzenie do wytwarzania mikrokapsulek zawierających drobnoustroje. Charakterystyczną cechą tego rozwiązania jest formowanie kropelek kontaktujących się z lustrem cieczy za pomocą porowatej przegrody.

Z amerykańskiego opisu patentowego **US 6 033 888** znany jest proces mikrokapsułkowania komórek drobnoustrojów, który polega na rozpraszaniu zestalanych kropelek przy użyciu ultradźwięków. Twórcy rozwiązania opracowali nowy proces, który wzmocnił mikrokapsułki alginianu i ich tolerancję na kontakt z inną substancją – cytrynianem, jednak i w tym procesie tworzy kropelki alginianu o odpowiedniej wielkości, które następnie wprowadza się na odpowiednią głębokość do roztworu żelującego.

Znany z polskiego opisu patentowego **PL235870** sposób wytwarzania mikrokapsulek typu rdzeń/otoczka modyfikowanych tlenkiem grafenu, w technologii współosiowego wytłaczania z wykorzystaniem technologii wibracji dysz oraz elektrostatycznego rozpraszania uformowanych kropelek, charakteryzuje się tym, że sporządza się wodny roztwór alginianu o stężeniu od 0,01% (w/o) do 30,0% (w/o), z dodatkiem tlenku grafenu w ilości od 0,01% (w/o) do 10,0% (w/o) w stosunku do objętości roztworu alginianu, oraz emulsję z wodnego roztworu substancji biologicznie aktywnej oraz roztworu poliestru w rozpuszczalniku organicznym, w której poliestr jest wybrany z grupy zawierającej: polimery kwasu mlekowego, polimery kwasu glikolowego, polimery kwasu ε-kapronowego, i ich kopolimery, a rozpuszczalnikiem substancji biologicznie aktywnej jest roztwór soli fizjologicznej lub biologicznie dopuszczalny bufor, zaś stosunek fazy organicznej do fazy wodnej wynosi od 1:1 do 20:1, następnie z tego wodnego roztworu oraz tej emulsji formuje się mikrokapsułki, które sieciuje się w wodnym roztworze chlorku wapnia lub chlorku strontu o stężeniu od 1 mM do 1 M, w czasie od 0,1 godziny do 24 godzin, po czym mikrokapsułki płucze się wodą, zamraża się i liofilizuje.

W zgłoszeniu **WO2015019307** przedstawiono mikrokapsułki do ochrony probiotyków i sposoby ich wytwarzania. W niektórych postaciach mikrokapsułki według zgłoszenia stosuje się do dostarczania probiotyków, kombinacji probiotyków i prebiotyków i/lub synbiotyków przez żołądek ssaka do jego dolnego odcinka przewodu pokarmowego. W niektórych przykładach wykonania mikrokapsułki zawierają

biopolimer i białko pochodzenia roślinnego. W niektórych przykładach wykonania mikrokapsułki obejmują jako biopolimer alginian, jotakaragen lub deacylowaną gumę gellan. W niektórych przykładach wykonania mikrokapsułki zawierają białko z ciecierzycy, białko z grochu lub białko sojowe jako białko pochodzenia roślinnego. Emulsję zawierającą biopolimer, białko pochodzenia roślinnego i materiał probiotyczny do kapsułkowania można poddać sieciowaniu w celu utworzenia mikrokapsułki.

Z amerykańskiego opisu patentowego **US 11123384** znane są mikrokapsułkowane bakterie probiotyczne chronione przed degradacją przez kwaśne roztwory wodne, wysokie stężenia soli kwasów żółciowych, podwyższone temperatury i długotrwałe przechowywanie oraz wykazujące zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu z ich odpowiednikami niemikrokapsułkowanymi. Mikrokapsułkowane bakterie probiotyczne obejmują bakterie probiotyczne zamknięte w mikrokapsułkach. Bakterie probiotyczne to żywe komórki *Lactobacillus plantarum*. Każda z mikrokapsulek zawiera matrycę żelowanego alginianu. Matryca całkowicie otacza bakterie probiotyczne w matrycy. Zewnętrzna powierzchnia matrycy ma powłokę składającą się zasadniczo z jednego oleju roślinnego wybranego z grupy składającej się z oliwy z oliwek i oleju rzepakowego lub zewnętrzna powierzchnia matrycy jest traktowana chlorkiem sodu. Mikrokapsułkowane bakterie probiotyczne mają średni rozmiar cząstek poniżej 1000 mikronów (μm).

W literaturze brak jest precyzyjnych wskazań jakie parametry wejściowe, dla procesu enkapsulacji mikroemulsyjnej z zastosowaniem homogenizacji ultradźwiękowej lub mechanicznej, w istotny sposób wpływają na parametry wyjściowe – wielkość i stabilność mikrokapsulek alginianowych otrzymywanych w tym procesie.

Według wynalazku, sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne zamknięte wewnątrz kapsułki wytworzonej z polimeru naturalnego alginianu z alg brunatnych, w którym to sposobie przygotowuje się roztwór naturalnego polimeru z bakteriami probiotycznymi – komponent A, przygotowuje się komponent B w postaci fazy olejowej zawierający surfaktanty, przygotowuje się roztwór sieciujący – komponent C, a następnie miesza poszczególne komponenty, charakteryzuje się tym, że czynnik sieciujący – komponent C, który stanowi 0,1–0,5 M roztwór wodny zawierający jony Ca^{2+} wprowadza się z prędkością 0,3–2 ml na minutę, zachowując stosunek masowy roztworu alginianu do roztworu czynnika sieciującego na poziomie 1:1, przy czym uprzednio wodny roztwór alginianu sodu, o stężeniu 1–5% wagowych, miesza się z roztworem MRS, w którym stężenie bakterii probiotycznych wynosi 10^8 – 10^{12} CFU/ml, a roztwór polimerowy łączy się z roztworem bakterii probiotycznych w stosunku 4:1, w temperaturze od 20 do 25°C (komponent A), następnie do układu wprowadza się fazę olejową – (komponent B), którą stanowi mieszanina triglicerydów kaprynowo-kaprylowych z surfaktantem, mieszanie komponentów A i B poddaje się mieszaniu, za pomocą mieszadła mechanicznego, z prędkością w przedziale 400–800 rpm, w czasie 5–10 minut, utrzymując temperaturę układu dyspersyjnego na poziomie 25°C. Uzyskaną preemulsję poddaje się procesowi homogenizacji, dla uzyskania emulsji, a następnie do otrzymanego układu, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 400–800 rpm, wprowadza się czynnik sieciujący. Mieszanie komponentów A, B i C poddaje się sieciowaniu, w temperaturze od 20–25°C, przez okres od 5 do 30 minut, korzystnie 10 minut. W celu separacji mikrokapsulek, emulsję olejową poddaje się procesowi wirowania, stabilizuje w temperaturze 5–7°C, przez okres 24 godzin, a następnie po oddzieleniu fazy olejowej, wydzielone mikrokapsułki przemywa się 1% wodnym roztworem chlorku sodu i poddaje procesowi liofilizacji.

Korzystnie, jony Ca^{2+} pochodzą z roztworu soli wapnia, takiego jak roztwór chlorku wapnia o stężeniu 0,1–0,5M.

Korzystnie, komponent A z komponentem B łączy się w stosunku wagowym 1:5.

Korzystnie, wodny roztwór alginianu sodu – roztwór polimerowy – przygotowany jest przez rozpuszczenie od 1 do 5 części wagowych, soli sodowej kwasu alginowego z alg brunatnych w wodzie w ilości od 95 do 99,0 części wagowych, korzystnie 98 części wagowych.

Korzystnie, zawartość surfaktantu wynosi 0,5 do 2,0% wagowych w stosunku do masy fazy wodnej.

Korzystnie, jako emulgatory stosuje się surfaktanty z grupy niejonowych związków powierzchniowo czynnych, takie jak oksyetylenowane pochodne estrów sorbitanu i kwasów tłuszczowych: laurynowego, palmitynowego, oleinowego oraz estry sorbitanu i kwasów tłuszczowych laurynowego, palmitynowego, oleinowego oraz ich mieszanin.

Korzystnie, jako bakterie probiotyczne stosuje się szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*, korzystnie *Lactobacillus casei*, korzystnie w ilości 10^8 – 10^{12} CFU/ml.

Korzystnie, proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator typu „rotor-stator” przy prędkości 7000–12000 rpm, korzystnie przy prędkości 8000 rpm. Korzystnie, proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator ultradźwiękowy i amplitudę od 50 do 90%, korzystnie od 65 do 70%.

Korzystnie, proces wirowania dla oddzielenia mikrokapsulek prowadzony jest z prędkością 500 do 3 000 rpm.

Korzystnie w sposobie według wynalazku otrzymuje się kapsułki o kontrolowanych rozmiarach, o wielkości od 10 do 500 mikrometrów.

Największy wpływ na wielkość mikrokapsulek alginianowych, otrzymywanych sposobem według wynalazku ma szybkość wkraplania oraz stężenie środka sieciującego.

Stosując homogenizację ultradźwiękową sposobem według wynalazku otrzymano stabilne kapsułki alginianowe o rozmiarach od 10 do 500 mikrometrów.

Otrzymane kapsułki mogą stanowić surowiec, będący nośnikiem probiotyków do stosowania w preparatach przeznaczonych do pielęgnacji i/lub leczenia skóry.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania.

Przykład 1

Wstępną emulsję – preemulsję, która była kierowana do sieciowania przygotowano poprzez zmieszanie fazy wodnej i fazy olejowej. Fazę wodną stanowił wodny roztwór alginianu sodu o stężeniu 2% wag. z bulionem MRS, w którym stężenie bakterii *Lactobacillus casei*, w wyniku namnożenia liofilizatu ATCC 334, wynosiło 10^{10} CFU/ml. Stosunek roztworu alginianu sodu do bulionu bakteryjnego wynosił 4:1. Fazę olejową stanowiła mieszanina triglicerydów kaprynowo-kaprylowych z surfaktantem polioksyetylenowanymi estrami sorbitanu i kwasu oleinowego. Stosunek masowy fazy wodnej do olejowej wynosił 1:5. Zawartość surfaktanta w dyspersji, w stosunku do masy fazy wodnej wynosiła 1%. Po połączeniu fazy olejowej i fazy wodnej, preemulsję mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego, z prędkością obrotów w przedziale 500 rpm, przez okres 10 minut, w temperaturze pokojowej – $T=25^{\circ}\text{C}$. Następnie mieszaninę stanowiącą preemulsję poddawano procesowi homogenizacji, stosując homogenizator typu „rotor-stator” przy prędkości 8000 rpm.

Przed homogenizacją połączone fazy: wodna (A) i olejowa (B) w wyniku mieszania mieszadłem mechanicznym tworzą układ nazywany preemulsją (taki układ nie jest jeszcze stabilny między innymi dlatego, że krople fazy wewnętrznej, w tym przypadku wodnej, mają różne rozmiary co sprzyja koalescencji i dopiero po homogenizacji otrzymujemy bardziej jednorodną a tym samym i bardziej stabilną fazę wewnętrzną – i tym samym układ można nazywać emulsją).

Do zhomogenizowanej emulsji W/O, zawierającej probiotyczny szczep bakterii, w kolejnym etapie ciągle mieszając (mieszadło magnetyczne, prędkość obrotów w 500 rpm) wkraplano z szybkością 1 ml na minutę, roztwór 0,3 M chlorku wapnia w celu utworzenia mikrokapsulek alginianowych. Stosunek masowy roztworu alginianu do roztworu chlorku wapnia wynosił 1:1. Mieszanie dyspersji mikrokapsulek alginianowych kontynuowano po zakończeniu wkraplania roztworu CaCl_2 jeszcze przez 10 minut. W kolejnym etapie, w celu oddzielenia otrzymanych w procesie mikrokapsulek, dyspersję olejową wirowano z szybkością 500 rpm przez 20 minut, pozostawiono na okres 24 godzin w temperaturze 5°C , a następnie po oddzieleniu fazy olejowej, mikrokapsułki poddano procesowi liofilizacji. Otrzymano mikrokapsułki alginianowe o rozmiarach $d = 10\text{--}500$ mikrometrów, zawierające bakterie probiotyczne – *Lactobacillus casei*.

Przykład 2

Wytworzono preemulsję przez zmieszanie fazy wodnej i fazy olejowej. Fazę wodną stanowi 2% roztwór wodny alginianu sodu z bulionem MRS, w którym stężenie bakterii *Lactobacillus plantarum* w wyniku namnożenia liofilizatu ATCC 8014 wynosiło 10^9 CFU/ml. Stosunek roztworu alginianu sodu do bulionu bakteryjnego wynosił 4:1. Fazę olejową stanowi mieszanina triglicerydów kaprynowo-kaprylowych z surfaktantem – oksyetylenowanymi estrami sorbitanu i kwasu oleinowego. Stosunek masowy fazy wodnej do olejowej wynosił 1:5. Zawartość surfaktanta w dyspersji, w stosunku do masy fazy wodnej wynosi 1,0%. Po połączeniu fazy olejowej i fazy wodnej, preemulsję mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego z prędkością obrotów w przedziale 600 rpm, w czasie 10 minut, w temperaturze pokojowej $T=25^{\circ}\text{C}$. Następnie mieszaninę stanowiącą preemulsję poddawano procesowi homogenizacji, stosując proces homogenizacji ultradźwiękowej i amplituda sonikacji – 69%. Do zhomogenizowanej emulsji W/O, zawierającej probiotyczny szczep bakterii, w kolejnym etapie ciągle mieszając przy użyciu mieszadła magnetycznego, przy prędkości obrotowej 600 rpm wkraplano z szybkością 1 ml na minutę roz-

twór 0,3 M chlorku wapnia, zachowując stosunek masowy roztworu alginianu do roztworu chlorku wapnia wynosił 1:1. Po zakończeniu wkraplania roztworu CaCl_2 mieszanie dyspersji mikrokapsulek alginianowych kontynuowano jeszcze przez 10 minut. W celu oddzielenia otrzymanych mikrokapsulek, dyspersję wirowano z szybkością 500 rpm, a następnie pozostawiono na okres 24 godzin w temperaturze 5°C. Po oddzieleniu od fazy olejowej, przemytciu roztworem NaCl, otrzymane mikrokapsułki poddano procesowi liofilizacji. Otrzymano liofilizowane mikrokapsułki alginianowe o rozmiarach $d = 10\text{--}500$ mikrometrów zawierające *Lactobacillus casei*.

Stanowiąca przedmiot rozwiązania metoda otrzymywania mikrokapsulek, w emulsji W/O, stanowi prosty, niewymagający specjalistycznej aparatury (np. wyposażonej w specjalne przegrody) proces. Parametry procesu homogenizacji oraz zmiana szybkości wkraplania i stężenia środka sieciującego (chlorku wapnia), pozwalają na uzyskanie z dużą precyzją stabilnych mikrokapsulek o kontrolowanych rozmiarach od 10 do 500 mikrometrów. Opracowana technika wytwarzania mikrokapsulek jest ekonomiczna i ekologiczna nie wymaga stosowania dużej ilości, drogich surowców, np. rozpuszczalników organicznych. Zasadniczą zaletą rozwiązania jest wysoka efektywność enkapsulacji bakterii probiotycznych w mikrokapsułkach.

Oznaczenia i skróty:

- MRS – podłoża hodowlane „De Man, Rogosa and Sharpe” do namnażania, hodowli bakterii;
 CFU – Colony Forming Unit – jednostki tworzące kolonię, jednostka określająca liczbę mikroorganizmów lub komórek w materiale badanym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mikrokapsulek zawierających bakterie probiotyczne zamknięte wewnątrz kapsułki wytworzonej z polimeru naturalnego alginianu z alg brunatnych, w którym to sposobie przygotowuje się roztwór naturalnego polimeru z bakteriami probiotycznymi – komponent A, przygotowuje się komponent B w postaci fazy olejowej zawierający surfaktanty, przygotowuje się roztwór sieciujący – komponent C, a następnie miesza poszczególne komponenty, **znamienny tym**, że czynnik sieciujący – komponent C, który stanowi 0,1–0,5 M roztwór wodny zawierający jony Ca^{2+} wprowadza się z prędkością 0,3–2 ml na minutę, zachowując stosunek masowy roztworu alginianu do roztworu czynnika sieciującego na poziomie 1:1, przy czym uprzednio wodny roztwór alginianu sodu, o stężeniu 1–5% wagowych, miesza się z roztworem MRS, w którym stężenie bakterii probiotycznych wynosi $10^8\text{--}10^{12}$ CFU/ml, a roztwór polimerowy łączy się z roztworem bakterii probiotycznych w stosunku 4:1, w temperaturze od 20 do 25°C (komponent A), następnie do układu wprowadza się fazę olejową – (komponent B), którą stanowi mieszanina triglicerydów kaprynowo-kaprylowych z surfaktantem, mieszaninę komponentów A i B poddaje się mieszanemu, za pomocą mieszadła mechanicznego, z prędkością w przedziale 400–800 rpm, w czasie 5–10 minut utrzymując temperaturę układu dyspersyjnego na poziomie 25°C, uzyskaną preemulsję poddaje się procesowi homogenizacji dla uzyskania emulsji, a następnie do otrzymanego układu, przy ciągłym mieszanym z prędkością 400–800 rpm, wprowadza się czynnik sieciujący, mieszaninę komponentów A, B i C poddaje się sieciowaniu, w temperaturze 20–25°C, przez okres od 5 do 30 minut, korzystnie 10 minut, separuje mikrokapsułki, poddając emulsję olejową procesowi wirowania, stabilizuje w temperaturze 5–7°C przez okres 24 godzin, a następnie po oddzieleniu fazy olejowej, wydzielone mikrokapsułki przemywa się 1% wodnym roztworem chlorku sodu i poddaje procesowi liofilizacji.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jony Ca^{2+} pochodzą z roztworu soli wapnia, takiego jak roztwór chlorku wapnia o stężeniu 0,1–0,5M.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że komponent A z komponentem B łączy się w stosunku wagowym 1:5.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodny roztwór alginianu sodu – roztwór polimerowy – przygotowuje się przez rozpuszczenie od 1 do 5 części wagowych, soli sodowej kwasu alginowego z alg brunatnych w wodzie w ilości od 95 do 99,0 części wagowych.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że wodny roztwór alginianu sodu – roztwór polimerowy – przygotowywany jest przez rozpuszczenie od 2 części wagowych, soli sodowej kwasu alginowego z alg brunatnych w wodzie w ilości 98 części wagowych.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawartość surfaktantu wynosi 0,5 do 2,0% wagowych w stosunku do masy fazy wodnej.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako emulgatory stosuje się surfaktanty z grupy niejonowych związków powierzchniowo czynnych, takie jak oksyetylenowane pochodne estrów sorbitanu i kwasów tłuszczowych: laurynowego, palmitynowego, oleinowego oraz estry sorbitanu i kwasów tłuszczowych laurynowego, palmitynowego, oleinowego oraz ich mieszaniny.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako bakterie probiotyczne stosuje się szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*, korzystnie *Lactobacillus casei*.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako bakterie probiotyczne stosuje się szczep *Lactobacillus casei*, a stężenie bakterii wynosi 10^8 – 10^{12} CFU/ml.
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator typu „rotor-stator” przy prędkości 7000–12000 rpm.
11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator typu „rotor-stator” przy prędkości 8000 rpm.
12. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator ultradźwiękowy i amplitudę od 50 do 90%.
13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że proces homogenizacji prowadzi się stosując homogenizator ultradźwiękowy i amplitudę 65–70%.
14. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces wirowania dla oddzielenia mikrokapsulek prowadzony jest z prędkością 500 do 3 000 rpm.
15. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że otrzymuje się kapsułki o kontrolowanych rozmiarach, o wielkości od 10 do 500 mikrometrów.

[7C]



(10) **PL 445990 A1**

(12) **Opis zgłoszeniowy wynalazku**
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **445990**
(22) Data zgłoszenia: **2023.09.01**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.04.08 BUP 15/2024**

(51) MKP:
A61K 8/99 (2017.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/368 (2006.01)
A61K 8/365 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/06 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(71) Zgłaszający: POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA KOŚCIUSZKI, Kraków, PL SIEĆ BADAWCZA LUKASIEWICZ-INSTYTUT PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO, Warszawa, PL	(72) Twórca(-y): ANNA ŁĘTOCHA, Wiśniowa, PL MAŁGORZATA MIASTKOWSKA, Kraków, PL ELŻBIETA SIKORA, Kraków, PL ALICJA MICHAŁCZYK, Warszawa, PL (74) Pełnomocnik: rzecz. pat. Lilianna Krawczyk, Tarnów, PL
--	---

(54) Tytuł:
Formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne

(57) Skróć opisu:
Przedmiotem zgłoszenia jest formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne, która charakteryzuje się tym, że zawiera: żywe bakterie probiotyczne zamknięte w mikrosferach polimerowych w ilości do 1% wagowych – komponent A, fazę wodną – komponent B, fazę olejową – komponent C, oraz substancje dodatkowe - komponent D, przy czym zawartość bakterii w komponencie A wynosi, co najmniej 10^3 jednostek tworzących kolonię na 1g mikrosfer polimerowych, a układ konserwujący stanowi benzoesan sodu oraz mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego w ilości od 1 do 4% wagowych, lub mieszanina kwasu dehydrooctowego i sorbinianu potasu od 0,3% do 1,2%, przy czym komponent B i komponent C tworzą emulsję olej w wodzie, która zawiera komponent A i D.

PL 445990 A1

Formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne

Przedmiotem wynalazku jest formuacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca żywe bakterie probiotyczne, które zamknięte są w mikrokapsułkach polimerowych.

Stan techniki:

Substancje z grupy pre- i probiotyków od lat stosowane są z powodzeniem jako składniki żywności i suplementów diety. W ciągu ostatnich lat znacząco wzrosło zainteresowanie preparatami kosmetycznymi lub dermokosmetycznymi, które zawierają szczepy bakterii probiotycznych. Ochrona skóry przed drobnoustrojami chorobotwórczymi i mikrobiom skóry to tematy bardzo aktualne. Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania mikrobiomu skóry wynikające między innymi z niewłaściwej higieny są przyczyną nadmiernego wysuszenia skóry, czy zmian chorobowych na przykład atopowego zapalenia skóry. Zachowanie prawidłowego mikrobiomu skóry oraz wywieranie pozytywnego wpływu na mikroflorę skóry w przypadku leczenia chorób skóry może zostać zapewnione poprzez zastosowanie w formuacji preparatów pielęgnacyjnych, czy kosmetycznych, żywych szczepów probiotycznych. Pozytywne działanie probiotyków w kompozycjach kosmetyków może być związane z uzupełnianiem mikrobiomu człowieka, wytwarzaniem różnych związków o działaniu przeciwutleniającym, nawilżającym, biobójczym, wykazujących aktywność biobójczą lub innych produktów fermentacji, które bezpośrednio lub pośrednio oddziałują na skórę lub inne narządy człowieka.

Wprowadzenie żywych szczepów bakteryjnych do formulacji kosmetycznej lub dermokosmetycznej przy jednoczesnym zachowaniu żywotności probiotyków, pomimo koniecznej obecności środków konserwujących w preparatach wodnych staje się możliwe poprzez zastosowanie mikrocząstek polimerowych wewnątrz, których zamknięte są żywe szczepy bakteryjne.

Mikrocząsteczki alginianu to biokompatybilne, biodegradowalne i nietoksyczne systemy dostarczania stosowane do kapsułkowania naturalnych substancji aktywnych, w tym probiotyków.

Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją FAO/WHO „probiotyki to żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi”. Najczęściej spotykanymi probiotykami są przedstawiciele rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Do tej pory w przemyśle kosmetycznym termin „probiotyk” był używany szerzej, ponieważ żywe mikroorganizmy mogą być stosowane w produktach kosmetycznych tylko w bardzo ograniczonym zakresie ze względu na fakt, że ich żywotność, czystość i działanie są trudne do kontrolowania. W celu wykorzystania żywych bakterii w produktach kosmetycznych należy zrezygnować z konserwantów, co jest bardzo trudne z punktu widzenia bezpieczeństwa kosmetyków i wymogów stawianych produktom kosmetycznym (rozporządzenie nr 1223/2009 w sprawie produktów kosmetycznych). Grupę surowców, łączących korzyści zdrowotne dla skóry w przypadku kosmetyków stanowią substancje, które nie są bezpośrednio żywymi bakteriami, ale zostały uzyskane za pomocą bakterii probiotycznych. Wśród nich wyróżniamy: produkty fermentacji, lizaty komórkowe, surowce po tyndylizacji i filtraty produktów fermentacji.

Opisane w literaturze patentowej zastosowania probiotyków w dermatologii i kosmetykach dotyczą w głównej mierze preparatów zawierających nieżywotne szczepy bakteryjne. Wprowadzane są one do kosmetyków w postaci metabolitów bakteryjnych: fermentów - patent **EP 2470159**, ekstraktów **KR20210052827**, czy lizatów - patent **EP 2704704**. Opis wynalazku **EP 2704704** ujawnia rozwiązanie, które dotyczy bakterii probiotycznych i/lub rozpuszczalnego metabolitu bakterii probiotycznych i/lub lizatu komórkowego bakterii probiotycznych do zastosowania w leczeniu zaburzenia związanego z funkcją ścisłego połączenia, charakteryzującego się tym, że bakterie probiotyczne, rozpuszczalny metabolit bakterii probiotycznych i/lub lizat komórkowy bakterii probiotycznych jest

przygotowany do podawania miejscowego. Wynalazek **EP 3888628** również dotyczy zastosowania filtrowanego lizatu bakterii probiotycznych do kosmetycznego, nieterapeutycznego zwiększania funkcji bariery skórnej, przy czym lizat bakterii probiotycznych pochodzi ze szczepu *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* lub *Bifidobacterium longum* i zastosowanie obejmuje miejscowe podawanie lizatu na skórę dla regeneracji lub naprawy bariery skórnej. W przypadku formułacji kosmetycznych i dermokosmetycznych zawierających żywe szczepy probiotyczne opisane są rozwiązania, które dotyczą preparatów niezawierających konserwantów, dlatego zalecane są do krótkotrwałego przechowywania (max. 2 tygodnie) w temperaturze 4-8 stopni Celsjusza.

Opis patentowy **FR 2957798** ujawnia kompozycję kosmetyczną lub dermatologiczną zawierającą fazę wodną i fazę olejową, przy czym wspomniana kompozycja jest typu emulsji woda w oleju i zawiera skuteczną ilość co najmniej jednego aktywnego żywego mikroorganizmu probiotycznego, przy czym wspomniany mikroorganizm jest obecny w fazie wodnej i zawiera od 0 do 0,001% wagowych środka konserwującego w stosunku do całkowitej masy kompozycji. Znane są kompozycje kosmetyczne zawierające bakterie probiotyczne, przy czym produkt kosmetyczny przygotowywany jest bezpośrednio przed użyciem. Patent **FR2913337** ujawnia proces obróbki kosmetycznej materiału keratynowego i obejmuje (a) dostarczenie liofilizowanej postaci co najmniej jednego żywego lub nieaktywnego mikroorganizmu lub jego metabolitów czy frakcji, (b) dostarczenie podłoża innego niż postać liofilizowana, (c) doraźne kontaktowanie postaci liofilizowanej w pożywkę tak, że solubilizacja i/lub dyspersja postaci liofilizowanej zachodzi w pożywkę, oraz (d) kontaktowanie otrzymanej mieszaniny z materiałem keratynowym. Niezależne zastrzeżenia patentowe obejmują: (1) produkt do pielęgnacji doraźnej, kosmetycznej lub dermatologicznej, do materiałów keratynowych, zawierający co najmniej jedną pierwszą kompozycję kosmetyczną lub dermatologiczną oraz drugą kompozycję, różną od pierwszej kompozycji, zawierającą co najmniej jedną liofilizowaną postać co najmniej jednego żywego lub nieaktywnego mikroorganizmu lub jego metabolitów czy frakcji; oraz (2) zestaw kondycjonujący zawierający co najmniej: pierwszą komorę zawierającą co najmniej jedną liofilizowaną postać co najmniej jednego mikroorganizmu lub jego metabolitów lub frakcji; drugą komorę zawierającą pożywkę różną od postaci liofilizowanej, gdzie druga komora jest, przed użyciem zestawu, odizolowana i

uszczelniona od pierwszej; oraz środki do łączenia pierwszej i drugiej komory, zgodnie z zamówieniem. Głównym ograniczeniem tego wynalazku jest konieczność przygotowania kompozycji probiotycznej bezpośrednio przed zastosowaniem.

Z patentu europejskiego **EP 3386478** znane jest zastosowanie kapsułek białkowo-polimerowych z bakteriami z rodzaju *Bacillus coagulans* w środkach do higieny osobistej i artykułach gospodarstwa domowego. Wynalazek zapewnia podejście do zachowania i ochrony bakterii probiotycznych w kompozycjach produktów do higieny osobistej/pielęgnacji zawierających środki powierzchniowo czynne. W wielu przypadkach bakterie Gram+ i/lub metabolity bakterii probiotycznych są stosowane w detergentowych kompozycjach do pielęgnacji ciała lub higieny domowej w celu poprawy właściwości użytkowych produktu. Dla ochrony bakterii probiotycznych przed składnikami kompozycji unieruchamia/kapsułkuje się bakterie w polimerowych kapsułkach pektynowo-alginianowych lub alginianowych, których polimerowa bariera pozwala na utrzymanie stabilnej żywotności bakterii w detergentowych środkach. Patent opiera się na inkubacji bakterii (zakapsułkowanych i niezakapsułkowanych) w ciągu 120 godzin w podwyższonej temperaturze – 37 °C. Zastosowane w rozwiązaniu mikrokapsułki mają rozmiary rzędu mm, od 0,2 do 5 mm. W zgłoszeniu patentowym **WO 2013/188626** opisany jest sposób przedłużenia żywotności bakterii po 3 tygodniach stażowania w wodzie, kapsułki probiotyczne i szczep probiotyczny, które zawierają probiotyk, związek przenoszący tlen i biokompatybilny środek wiążący. Kompozycje zawierające probiotyki mają stabilną żywotność probiotyków i są odpowiednie do włączania do wodnych preparatów do higieny osobistej, takich jak kosmetyczne i niekosmetyczne płyny, mydła, kremy, szampony, płyny do mycia ciała i tym podobne. Z europejskiego patentu **EP 4021193** znana jest bezwodna formuła składająca się z bakterii probiotycznych i mieszaniny olejów, jako nośnika.

Przedmiotem wynalazku **PL 438815** jest produkt kosmetyczny składający się z dwóch półproduktów: fazy olejowej, zawierającej unieczynnione – zliofilizowane bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* — 1% wag., emulgator w postaci oksyetylenowanych alkoholi tłuszczowych C12-13 - 14% wag., uwodorniony olej roślinny — 3,5% wag., alkany C15-19 i mieszanina estrów kwasów kaprylowego i kaprynowego z alkoholami z oleju

kokosowego — 16% wag., kokaprylanu i tokoferol — 6,5% wag., estry etylowe masła Shea — 20% wag., olej z nasion konopi siewnych — 10% wag., olej z awokado — 23% wag., tokoferol i olej z nasion słonecznika — 1% wag.; sylilan dimetylowy krzemionki — 5% wag.; oraz z fazy emulsyjnej, zawierającej wodę, emulgator oraz pozostałe składniki aktywne; który charakteryzuje się tym, że żywe bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* wraz ze swoimi metabolitami są w postaci proszku suszonego rozpyłowo. Kolejnym przedmiotem wynalazku **PL 438815** jest zastosowanie ujawnionego produktu kosmetycznego do poprawy kondycji i wyglądu skóry, przy czym poprawa kondycji skóry oznacza poprawę nawilżenia skóry o 18% - 23%, zmniejszenie widoczności zmarszczek o 13 - 18%, poprawę elastyczności skóry o 17 - 22%, obniżenie pH skóry o wartość 0,5 - 0,6 i zmniejszenie parowania wody z rógowej warstwy naskórka o 23 - 28%. Na rynku kosmetycznym dostępne są produkty deklarujące w swoim składzie żywe szczepy bakterii *Lactobacillus* na przykład kosmetyk belgijskiej firmy YUN zawierający kapsułkowane szczepy *Lactobacillus*.

W literaturze naukowej, jak i patentowej brak jest informacji na temat formułacji kosmetycznej, w postaci emulsji O/W, stabilizowanej mikrobiologicznie układem konserwującym, zawierającej żywe bakterie probiotyczne inkorporowane w mikrosferach alginianowych, o rozmiarach poniżej 200 µm.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja preparatu kosmetycznego, w postaci emulsji hydrofilowej typu olej w wodzie (O/W), zawierająca jako składnik aktywny mikrokapsułki polimerowe z żywymi bakteriami probiotycznymi – szczep *Lactobacillus casei*. Skład preparatu, a w szczególności układ konserwujący zastosowany w kompozycji zapewniają ochronę zakapsułkowanych bakterii zarówno przed degradacją jak i przed nadmiernym (niekontrolowanym) rozmnażaniem.

Istotę wynalazku stanowi skład formułacji, a w szczególności odpowiednio dobrany układ konserwujący, wpływający na żywotność zakapsułkowanych szczepów bakteryjnych w formułacji preparatu kosmetycznego/dermokosmetycznego.

Według wynalazku formuacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne, charakteryzuje się tym, że zawiera:

żywe bakterie probiotyczne zamknięte w mikrosferach polimerowych w ilości do 1% wagowych – komponent A,

fazę wodną - komponent B,

fazę olejową - komponent C,

oraz substancje dodatkowe - komponent D, przy czym zawartość bakterii w komponencie A wynosi, co najmniej 10^3 jednostek tworzących kolonię na 1g mikrosfer polimerowych, a układ konserwujący stanowi benzoesan sodu oraz mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego w ilości od 1 do 4% wagowych, lub mieszanina kwasu dehydrooctowego i sorbinianu potasu od 0,3% do 1,2%, w której komponent B i komponent C tworzą emulsję olej w wodzie zawierającą komponent A i D.

Korzystnie, emulsja olej w wodzie w formuacji według wynalazku, która powstała z komponentu B i C składa się z:

- a. mieszaniny stearynianu sorbitanu, estrów kwasów tłuszczowych z oleju kokosowego i sacharozy w ilości od 1 do 5% masowych,
- b. mieszaniny stearynianu gliceryny, estrów poliglicerolu 6 i kwasów palmitynowego i bursztynowego, alkoholu cetearylowego w ilości od 3% do 10% masowych,
- c. emolientów w ilości od 13 do 23% masowych,
- d. substancji konserwujących: benzoesan sodu i mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego, w ilości od 1 do 4% wagowych lub sorbinian potasu i kwas dehydrooctowy w ilości od 0,3% do 1,2%,
- e. modyfikatora reologii w ilości od 0,1% do 0,5% masowych,
- f. oraz wody, w ilości stanowiącej uzupełnienie do 100% masowych formuacji.

Korzystnie, mikrosfery zawierają żywe bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*.

Korzystnie, żywe bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* to szczep *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Korzystnie, mikrosfery polimerowe zostały wykonane z polimerów naturalnych takich jak: alginiany, chitozan, pektyna i/lub polisacharydów i/lub związków białkowych np. kolagenu.

Korzystnie, mikrosfery polimerowe to mikrosfery alginianowe.

Korzystnie, mikrosfery alginianowe mają rozmiary poniżej 200 μm .

Korzystnie, mikrosfery zawierające żywe bakterie powstały przez suszenie rozpyłowe, suszenie w złożu fluidyzacyjnym, ekstruzję, emulsyfikację lub inne dostępne techniki.

Korzystnie, modyfikator reologii stanowi substancja z grupy hydrokoloidów pochodzenia naturalnego, korzystnie guma ksantanowa, kolagen, skrobia, kwas hialuronowy lub jego sole.

Korzystnie, konserwant użyty w formulacji należy do grupy pochodnych kwasów organicznych, w tym kwasu benzoowego i/lub kwasu sorbowego i/lub kwasu dehydrooctowego i/lub kwasu salicylowego i/lub kwasu parahydroksybenzoowego i/lub ich mieszanin.

Korzystnie, w skład substancji konserwujących wchodzi benzoosan sodu w ilości od 0,2 do 0,5% wagowych, oraz mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego w proporcji 1 : 1 w ilości od 0,5 do 4% wagowych.

Korzystnie, stosunek benzoosanu sodu do mieszaniny soli sodowych kwasu anyżowego i lewulinowego znajduje się w przedziale 1 : 4.

Korzystnie, w skład substancji konserwujących wchodzi kwas dehydrooctowy w ilości od 0,3 do 0,6 % wagowych i sorbinian potasu w ilości 0,2 do 0,6 % wagowych.

Korzystnie, stosunek kwasu dehydrooctowego do sorbinianu potasu wynosi 1 : 0,83.

Korzystnie, emolient należy do grupy olejów roślinnych niekomodogennych lub stanowi mieszaninę olejów, np. olej z nasion łąkowej piany, olej z ogórecznika, olej z czarnej porzeczki, olej z pestek malin, olej jojoba, olej winogronowy.

Korzystnie, stosunek związków w mieszaninie estrów sacharozy z kwasami oleju kokosowego i stearynianu sorbitanu wynosi 1,2–1,5 : 0,8–1,1.

Korzystnie, stosunek stearynianu gliceryny : alkoholu cetearylowego : estrów poliglicerolu-6 z kwasami palmitynowym i bursztynowym wynosi 1,8–2 : 0,8–1,1 : 3,3–3,6.

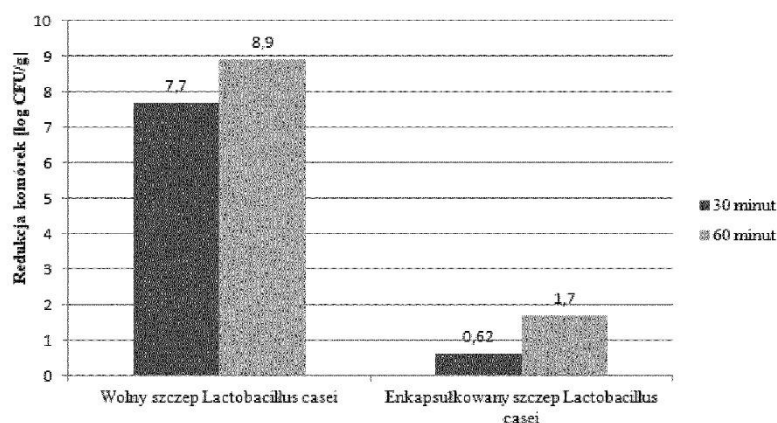
Korzystnie, substancje dodatkowe – komponent D stanowią: regulator pH i/lub substancje zapachowe.

Stanowiąca przedmiot rozwiązania formuła kosmetyczna/dermokosmetyczna to emulsja olej w wodzie, konserwowana

wyselekcjonowanymi układami konserwantów, które należą do grupy pochodnych kwasów organicznych, a zarazem zawierającą żywotne bakterie probiotyczne. Rodzaj *Lactobacillus* posiada status GRAS (ang. generalny recognized as safe), co oznacza „bezpieczne w stosowaniu”. Szczep wprowadzany jest do formulacji, jako enkapsulowany składnik nośnika – mikrosfer alginianowych i cechuje się rozmiarami poniżej 200 μm , co stanowi kolejną przewagę w odniesieniu do nośników znanych ze stanu techniki.

Jako konserwant, w formulacji według wynalazku, zastosowano układ składający się z: benzoenu sodu oraz mieszaniny soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego lub mieszaniny kwasu dehydrooctowego i sorbinianu potasu. Dokonano oceny przeżywalności bakterii w roztworze konserwującym. W tym celu do 1 g kapsulkowanych probiotyków dodano 9 ml sterylnego cytrynianu sodu o stężeniu 2 mol/L ($\text{pH} = 6$) i inkubowano w temperaturze pokojowej (20°C) przez 30 i 60 minut. Oceny żywotności komórek probiotycznych wolnych i zakapsulkowanych dokonano poprzez zliczanie kolonii bakteryjnych wyrosłych na płytkach z agarowym podłożem MRS (warunki inkubacji; 37°C , 72 godz.) po użyciu techniki inokulacji Pour Plate. Uzyskane wyniki wyrażano w CFU/g (liczba jednostek tworzących kolonię (jtk)/g).

Na rysunku 1 przedstawiono wpływ działania układu konserwującego na przeżywalność bakterii w roztworze konserwującym.



Rys.1 - Wpływ działania układu konserwującego na przeżywalność bakterii.

Redukcja komórek bakteryjnych w przypadku zawiesiny wolnych komórek *Lactobacillus casei* wynosiła 7,70 logCFU/g po 30 min. oraz 9,90 logCFU/g po 60 min. Wpływ układu konserwującego po obu czasach kontaktu w przypadku enkapsulowanego szczepu *Lactobacillus casei* był stosunkowo niewielki powodując spadek liczebności komórek o 0,62 logCFU/g po 30 min i o 1,7logCFU/g po 60 min, co świadczy o skutecznej ochronie szczepu na działanie układu konserwującego i odpowiednim jego doborze.

Niniejszy wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania, które ilustrują rozwiązanie i nie powinny być uznane za ograniczające zakres ochrony patentowej.

Przykład 1.

Skład opracowanej formułacji kosmetycznej - emulsja O/W przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Skład opracowanej formułacji kosmetycznej:

Komponent	Skład receptury preparatu	Zawartość [%mas.]
A	Mikrosfery polimerowe zawierające bakterie probiotyczne	1
B	Stearynian sorbitanu (50-100%); estry sacharozy z kwasami oleju kokosowego (5-10%)	2,5
	Modyfikator reologii	0,2
	Woda (25-35%); gliceryna (30-50%); sól sodowa kwasu lewulinowego (10-20%); sól sodowa kwasu anyżowego (4-7%)	2
	Benzoesan sodu	0,5
	Woda	do 100 składu formułacji
C	Stearynian gliceryny (50-100%); estry poliglicerolu-6 i kwsów palmitynowego i bursztynowego (25-50%); alkohol cetearylowy (10-25%)	4,5
	Emolient - olej z nasion łkowej piany	15
D	Kompozycja zapachowa	q.s.
	Kwas cytrynowy	q.s.

Sposób przygotowania preparatu kosmetycznego:

Osobno odważono składniki dla komponentu B i komponentu C, następnie podgrzewano każdą mieszaninę do temperatury $T=70^{\circ}\text{C}$ aż do uzyskania jednorodnych układów. W kolejnym etapie połączono komponenty wlewając komponent C (olejowy) do komponentu B (wodnego). Po połączeniu komponentów, mieszanie kontynuowano w temperaturze 70°C , do uzyskania jednorodnego, homogenicznego układu emulsyjnego. W kolejnym etapie emulsję schłodzono do temperatury 40°C i wprowadzono składnik aktywny (mikrosfery alginianowe z bakteriami *Lactobacillus casei*) – komponent A oraz kompozycję zapachową (komponent D). Następnie sprawdzono i wyregulowano pH, poprzez dodatek kwasu cytrynowego. Kompozycja powinna mieć wartość pH w zakresie 5,4 – 5,9. Mieszanie kontynuowano do schłodzenia masy emulsyjnej do temperatury $T=25^{\circ}\text{C}$.

Przykład nr 2.

W tabeli 2 przedstawiono skład formułacji kosmetycznej - emulsja O/W.

Tabela 2. Skład opracowanej formułacji kosmetycznej:

Komponent	Skład receptury preparatu	Zawartość [%mas.]
A	Mikrosfery polimerowe zawierające bakterie probiotyczne	1
B	Stearynian sorbitanu (50-100%); estry sacharozy z kwasami oleju kokosowego (5-10%)	2,5
	Modyfikator reologii	0,2
	Kwas dehydrooctowy	0,6
	Sorbinian potasu	0,5
	Woda	do 100 składu formulacji
C	Mieszanina stearynianu gliceryny (50-100%); alkoholu cetearylowego (10-25%); i estrów poliglicerolu-6 z kwasami palmitynowym i bursztynowym (25-50%);	4,5
	Emolient - olej z pestek malin	15
D	Kompozycja zapachowa	q.s.
	Kwas cytrynowy	q.s.

Preparat kosmetyczny przygotowano zgodnie ze sposobem ujawnionym w przykładzie nr 1.

Oceniono żywotność zakapsułkowanych bakterii probiotycznych - *Lactobacillus casei* - w formulacji kosmetycznej zawierającej mikrosfery i określony układ konserwujący (Tabela 3). Ocenę dokonano bezpośrednio po wprowadzeniu mikrosfer do kosmetyku, a następnie po 7 dniach, po 30 dniach oraz po 120 dniach przechowywania. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Ocena żywotności zakapsułkowanych bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* w formulacji kosmetycznej zawierającej mikrosfery.

Preparat kosmetyczny na bazie formulacji w postaci kremu							
Okres przechowywania							
Bezpośrednio po otrzymaniu		14 dni		30 dni		120 dni	
Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]
3,2x10 ⁸	3,03	3,52x10 ⁶	3,99	1,78x10 ⁶	4,29	1,35x10 ⁶	4,41

Początkowa gęstość szczepu *Lactobacillus casei* przed włączeniem do formulacji kosmetycznej wynosiła 10,54 log CFU/ml. Bezpośrednio po utworzeniu formulacji kosmetycznej zaobserwowano spadek liczebności komórek probiotycznych o 3,03 log. Badania wykonane w odstępach 14, 30 i 120 dni przechowywania kosmetyku wykazały obniżenie przeżywalności komórek bakterii w zakresie 0,96 -1,38 log w porównaniu do stanu wyjściowego, co świadczy o tym, że żywotność bakterii po czasie 4 miesięcy jest na podobnym, kontrolowanym poziomie.

Dla porównania dokonano także oceny żywotności wolnego szczepu bakterii *Lactobacillus casei* w formulacji kosmetycznej (Tabela 4). Początkowa gęstość szczepu włączonego do formulacji kosmetycznej w postaci wolnych komórek wynosiła 9,05 log CFU/ml (Tabela 4).

Tabela 4. Żywotność wolnych bakterii probiotycznych (*Lactobacillus casei*) w formulacji kosmetycznej.

Bezpośrednio po otrzymaniu		7 dni		30 dni		60 dni	
Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]	Przeżywalność [CFU/g]	Redukcja [log]
$1,55 \times 10^8$	0,86	$1,2 \times 10^4$	4,97	$1,8 \times 10^2$	6,8	0	9,05

Bezpośrednio po otrzymaniu formulacji kosmetycznej liczebność komórek *Lactobacillus casei* spadła o 0,86 log. Nieco większy spadek żywotności komórek bakterii probiotycznych zaobserwowano po 7 dniach i 30 dniach przechowywania kosmetyku i wynosił on odpowiednio 4,97 log oraz 6,8 log. Po 2 miesiącach przechowywania stwierdzono całkowitą inaktywację *Lactobacillus casei* w formulacji kosmetycznej.

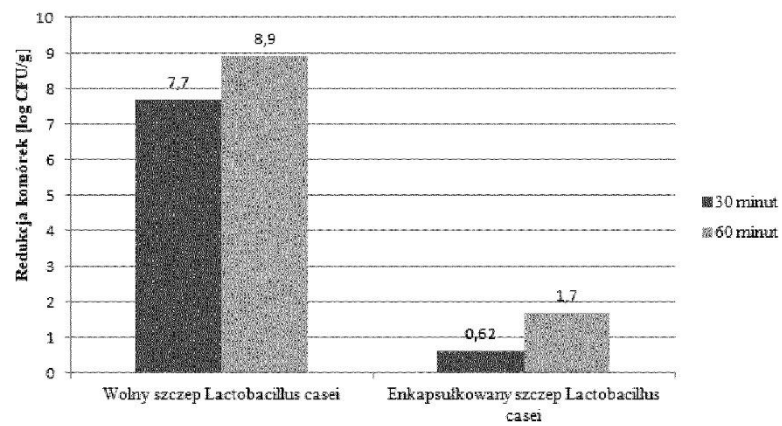
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdza się, iż nośnik w postaci mikrosfer alginianowych pozwala na przeżycie bakterii probiotycznych w formulacji, pomimo zastosowania układu konserwującego. Natomiast w przypadku wprowadzenia do preparatu wolnego szczepu bakteryjnego (braku ochrony szczepu w postaci mikrosfer), układ konserwujący powoduje całkowitą redukcję komórek probiotycznych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Formulacja kosmetyczna lub dermokosmetyczna zawierająca bakterie probiotyczne , **znamienna tym, że** zawiera:
 - żywe bakterie probiotyczne zamknięte w mikrosferach polimerowych w ilości do 1% wagowych – komponent A,
 - fazę wodną - komponent B,
 - fazę olejową - komponent C,
 - oraz substancje dodatkowe - komponent D, przy czym zawartość bakterii w komponencie A wynosi, co najmniej 10^3 jednostek tworzących kolonię na 1g mikrosfer polimerowych, a układ konserwujący stanowi benzoesan sodu oraz mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego w ilości od 1 do 4% wagowych, lub mieszanina kwasu dehydrooctowego i sorbinianu potasu od 0,3% do 1,2%, przy czym komponent B i komponent C tworzą emulsję olej w wodzie, która zawiera komponent A i D.
2. Formulacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** emulsja olej w wodzie powstaje z komponentu B i C i składa się z:
 - a. mieszaniny stearynianu sorbitanu, estrów kwasów tłuszczowych z oleju kokosowego i sacharozy w ilości od 1 do 5% masowych,
 - b. mieszaniny stearynianu gliceryny, estrów poliglicerolu 6 i kwasów palmitynowego i bursztynowego, alkoholu cetearylowego w ilości od 3% do 10% masowych,
 - c. emolientów w ilości od 13 do 23% masowych,
 - d. substancji konserwujących: benzoesan sodu i mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego,

- w ilości od 1 do 4% wagowych lub sorbinian potasu i kwas dehydrooctowy w ilości od 0,3% do 1,2%,
- e. modyfikatora reologii w ilości od 0,1% do 0,5% masowych,
- f. oraz wody, w ilości stanowiącej uzupełnienie do 100% masowych formułacji.
3. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** mikrosfery zawierają żywe bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*.
 4. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** żywe bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* to szczep *Lactobacillus casei* ATCC 393.
 5. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** mikrosfery polimerowe zostały wykonane z polimerów naturalnych takich jak: alginiany, chitozan, pektyna i/lub polisacharydów i/lub związków białkowych np. kolagenu.
 6. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** mikrosfery polimerowe to mikrosfery alginianowe.
 7. Formułacja według zastrz.6 **znamienna tym, że** mikrosfery alginianowe mają rozmiary poniżej 200 μm .
 8. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** mikrosfery zawierające żywe bakterie powstały przez suszenie rozpyłowe, suszenie w złożu fluidyzacyjnym, ekstruzję, emulsyfikację lub inne dostępne techniki.
 9. Formułacja według zastrz.2 **znamienna tym, że** modyfikator reologii stanowi substancja z grupy hydrokoloidów pochodzenia naturalnego, korzystnie guma ksantanowa, kolagen, skrobia, kwas hialuronowy lub jego sole.
 10. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** konserwant użyty w formułacji należy do grupy pochodnych kwasów organicznych, w tym kwasu benzoowego i/lub kwasu sorbowego i/lub kwasu dehydrooctowego i/lub kwasu salicylowego i/lub kwasu parahydroksybenzoowego i/lub ich mieszanin.
 11. Formułacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** w skład substancji konserwujących wchodzi benzoan sodu w ilości od 0,2 do 0,5% wagowych, oraz mieszanina soli sodowej kwasu anyżowego i soli sodowej kwasu lewulinowego w proporcji 1 : 1 w ilości od 0,5 do 4% wagowych.

12. Formulacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** stosunek benzoesu sodu do mieszaniny soli sodowych kwasu anyżowego i lewulinowego znajduje się w przedziale 1 : 4.
13. Formulacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** w skład substancji konserwujących wchodzi kwas dehydrooctowy w ilości od 0,3 do 0,6 % wagowych i sorbinian potasu w ilości 0,2 do 0,6 % wagowych.
14. Formulacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** stosunek kwasu dehydrooctowego do sorbinianu potasu wynosi 1 : 0,83.
15. Formulacja według zastrz.2 **znamienna tym, że** emolient należy do grupy olejów roślinnych niekomodogennych lub stanowi mieszaninę olejów, np. olej z nasion łąkowej piany, olej z ogórecznika, olej z czarnej porzeczki, olej z pestek malin, olej jojoba, olej winogronowy.
16. Formulacja według zastrz.2 **znamienna tym, że** stosunek związków w mieszaninie estrów sacharozy z kwasami oleju kokosowego i stearynianu sorbitanu wynosi 1,2–1,5 : 0,8–1,1.
17. Formulacja według zastrz.2 **znamienna tym, że** stosunek stearynianu gliceryny : alkoholu cetearylowego : estrów poliglicerolu-6 z kwasami palmitynowym i bursztynowym wynosi 1,8–2 : 0,8–1,1 : 3,3–3,6.
18. Formulacja według zastrz.1 **znamienna tym, że** substancje dodatkowe – komponent D stanowią: regulator pH i/lub substancje zapachowe.



Rys.1 - Wpływ działania układu konserwującego na przeżywalność bakterii.



URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

PL 445990 A1

al. Niepodległości 188/192
00-950 Warszawa, skr. poczt. 203
tel.: (+48) 22 579 05 55 | fax: (+48) 22 579 00 01
e-mail: kontakt@uprp.gov.pl | www.uprp.gov.pl

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.445990

Klasyfikacja zgłoszenia: A61K 8/99, A61K 8/73, A61K 8/368, A61K 8/365, A61K 8/49, A61K 8/06, A61Q 19/00		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: A61K, A61Q		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI, X-FULL, bazy UPRP, Google		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Lebeer S. i in., "Topical Cream with Live Lactobacilli Modulates the Skin Microbiome and Reduce Acne Symptoms", bioRxiv 2018, doi: https://doi.org/10.1101/463307 ,	1-18
A	FR2957798 A1 (OREAL [FR]) 30-09-2011	1-18
A	WO2022249194 A1 (TAGRA BIOTECHNOLOGIES LTD [IL]) 01-12-2022	1-18
A	PL438815 A1 (PORADZISZ SYLWIA BIOTEAM [PL]) 14-03-2022	1-18
☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.		

Sprawozdanie wykonał/-a:

Marta Okraska
Asesor

Data:

04.01.2024

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 01.09.2023 r..

15. Oświadczenia współautorów

Dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
ul. Warszawska 24
31-155 Kraków

Kraków, 05.05.2025 r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], M. Miastkowska, E. Sikora, Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications, Polymers, 2022, 14, 3834
DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej w zakresie konceptualizacji, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac. Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 20%.



podpis

Dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

Kraków, 05.05.2025 r.

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], M. Miastkowska, E. Sikora, Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications, Polymers, 2022, 14, 3834
DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej w zakresie konceptualizacji, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac. Mój udział w powstaniu publikacji określiłam na 20%.



.....
podpis

mgr Alicja Michalczyk

Kraków, 05.05.2025 r.

Sieć Badawcza Łukasiewicz

Instytut Przemysłu Organicznego

ul. Annopol 6

03-236 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier, Chemical and Process Engineering: New Frontiers, 2023, 44(3), e20

DOI: 10.24425/cpe.2023.146722

✉ Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na określeniu efektywności i żywotności zakapsułkowanych probiotyków w czasie. Brałam również udział w interpretacji wyników przeprowadzonych analiz oraz opisanu rezultatów w pierwotnej wersji manuskryptu. Mój udział w powstaniu publikacji określam na 20%.



podpis

Dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
ul. Warszawska 24
31-155 Kraków

Kraków, 05.05.2025 r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier, Chemical and Process Engineering: New Frontiers, 2023, 44(3), e20

DOI: 10.24425/cpe.2023.146722

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określam na 10%.

Małgorzata Miastkowska

podpis

Dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

Kraków, 05.05.2025 r.

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Design of alginate microsphere formulation as a probiotics carrier, Chemical and Process Engineering: New Frontiers, 2023, 44(3), e20

DOI: 10.24425/cpe.2023.146722

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 10%.



.....
podpis

mgr Paulina Ostrowska

Kraków, 05.05.2025 r.

Sieć Badawcza Łukasiewicz

Instytut Przemysłu Organicznego

ul. Annopol 6

03-236 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Probiotics-Loaded Microspheres for
Cosmetic Applications, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183

DOI: <https://doi.org/10.3390/app14031183>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na określeniu żywotności komórek bakteryjnych w
formulacji kosmetycznej.

Mój udział w powstaniu publikacji określam na 1%.



podpis

mgr Alicja Michalczyk

Kraków, 05.05.2025 r.

Sieć Badawcza Łukasiewicz

Instytut Przemysłu Organicznego

ul. Annopol 6

03-236 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Probiotics-Loaded Microspheres for
Cosmetic Applications, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183

DOI: <https://doi.org/10.3390/app14031183>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na określeniu żywotności komórek bakteryjnych w czasie, w mikrosferach probiotycznych oraz formułacji kosmetycznej. Brałam również udział w interpretacji wyników przeprowadzonych analiz oraz opisanu rezultatów w pierwotnej wersji manuskryptu.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 20%.


podpis

Dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
ul. Warszawska 24
31-155 Kraków

Kraków, 05.05.2025 r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Probiotics-Loaded Microspheres for
Cosmetic Applications, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183

DOI: <https://doi.org/10.3390/app14031183>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji
wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad
całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 9%.



podpis

Dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

Kraków, 05.05.2025 r.

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora, Probiotics-Loaded Microspheres for
Cosmetic Applications, Applied Sciences, 2024, 14(3), 1183

DOI: <https://doi.org/10.3390/app14031183>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji
wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad
całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 5%.



.....
podpis

Dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
ul. Warszawska 24
31-155 Kraków

Kraków, 05.05.2025 r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, *Molecules*, 2024, 29, 5984

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określam na 10%.



podpis

Dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

Kraków, 05.05.2025 r.

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, *Molecules*, 2024, 29, 5984

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 10%.



.....
podpis

mgr Alicja Michalczyk

Kraków, 05.05.2025 r.

Sieć Badawcza Łukasiewicz

Instytut Przemysłu Organicznego

ul. Annopol 6

03-236 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, *Molecules*, 2024, 29, 5984

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na określeniu efektywności enkapsulacji i żywotności komórek bakteryjnych w czasie, w kapsułkach probiotycznych oraz formulacji oleożelowej. Brałam również udział w interpretacji wyników przeprowadzonych analiz.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 10%.


podpis

Dr Marta Liszka-Skoczylas

Kraków, 05.05.2025 r.

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja

Wydział Inżynierii i Technologii Żywności

ul. Balicka 122

30-149 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, *Molecules*, 2024, 29, 5984

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

✉ Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na przeprowadzeniu analizy właściwości lepkosprężystych formułacji oleożelowych. Brałam również udział w interpretacji wyników przeprowadzonych analiz.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 10%.


.....
podpis

Prof. dr hab. inż. Mariusz Witczak
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja
Wydział Inżynierii i Technologii Żywności
ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

Kraków, 05.05.2025 r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

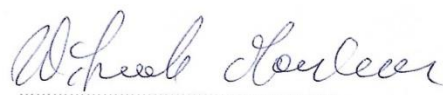
A. Łętocha[✉], Miastkowska M., Sikora E., Michalczyk A., Liszka-Skoczylas M., Witczak M., Hybrid Systems of Oleogels and Probiotic-Loaded Alginate Carriers for Potential Application in Cosmetics, *Molecules*, 2024, 29, 5984

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29245984>

✉ Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na interpretacji wyników przeprowadzonych analiz właściwości lepkosprężystych formułacji oleożelowych.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 5%.



podpis

Dr hab. inż. Małgorzata Miastkowska, prof. PK
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
ul. Warszawska 24
31-155 Kraków

Kraków, 05.05.2025r.

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora E., Effect of Encapsulation of Lactobacillus casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria, ACS Applied Materials&Interfaces, 2024, 16(39), 52878-52893

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.4c10187?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, edycji pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje oraz nadzorze nad całością prac.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 8%.



podpis

mgr Alicja Michalczyk

Kraków, 05.05.2025 r.

Sieć Badawcza Łukasiewicz

Instytut Przemysłu Organicznego

ul. Annopol 6

03-236 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora E., Effect of Encapsulation of Lactobacillus casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria, ACS Applied Materials&Interfaces, 2024, 16(39), 52878-52893

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.4c10187?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na określeniu efektywności enkapsulacji i żywotności komórek bakteryjnych w czasie, w mikrosferach probiotyczno-prebiotycznych. Brałam również udział w interpretacji wyników przeprowadzonych analiz.

Mój udział w powstaniu publikacji określłam na 15%.


.....
podpis

Dr hab. inż. Elżbieta Sikora, prof. PK

Kraków, 05.05.2025 r.

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji naukowej i pracach realizowanych wspólnie
z mgr inż. Anną Łętocha

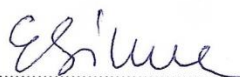
A. Łętocha[✉], A. Michalczyk, M. Miastkowska, E. Sikora E., Effect of Encapsulation of Lactobacillus casei in Alginate-Tapioca Flour Microspheres Coated with Different Biopolymers on the Viability of Probiotic Bacteria, ACS Applied Materials&Interfaces, 2024, 16(39), 52878-52893

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.4c10187?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as>

[✉]Autor korespondencyjny

Mój udział w powstaniu publikacji polegał na konsultacji naukowej z zakresu interpretacji wyników, nadzorze nad całością prac oraz pozyskiwaniu funduszy.

Mój udział w powstaniu publikacji określałam na 7%.



.....
podpis