(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(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 mikrokapsułek zawierających bakterie probiotyczne

PL 246674 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mikrokapsułek 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, toteż w wyniku mikroenkapsulacji otrzymywany jest produkt kompozytowy – mikrokapsułki, 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 międzyfazowa 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, mikrokapsułek i mikrosfer. Najczęściej stosowane są w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Do popularnych metod otrzymywania kapsułek 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 mikrokapsułek 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 zamykanej, a drugi zawiera substancje wchodzące w reakcje 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 mikrokapsułek zawierających drobnoustroje. Charakterystyczną cechą tego rozwiązania jest formowanie kropel 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 kropel 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 mikrokapsułek typu rdzeń/otoczka modyfikowanych tlenkiem grafenu, w technologii współosiowego wytłaczania z wykorzystaniem technologii wibracji dysz oraz elektrostatycznego rozpraszania uformowanych kropel, 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 poliester 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 mikrokapsułek 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 mikrokapsułek alginianowych otrzymywanych w tym procesie.

Według wynalazku, sposób otrzymywania mikrokapsułek 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, mieszaninę 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. Mieszaninę 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 mikrokapsułek, 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 – przygotowywany 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 mikrokapsułek 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 mikrokapsułek 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°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 mikrokapsułek alginianowych. Stosunek masowy roztworu alginianu do roztworu chlorku wapnia wynosił 1:1. Mieszanie dyspersji mikrokapsułek alginianowych kontynuowano po zakończeniu wkraplania roztworu $CaCl_2$ jeszcze przez 10 minut. W kolejnym etapie, w celu oddzielenia otrzymanych w procesie mikrokapsułek, dyspersje 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 = 10–500 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°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 mikrokapsułek alginianowych kontynuowano jeszcze przez 10 minut. W celu oddzielenia otrzymanych mikrokapsułek, dyspersje wirowano z szybkością 500 rpm, a następnie pozostawiono na okres 24 godzin w temperaturze 5°C. Po oddzieleniu od fazy olejowej, przemyciu roztworem NaCl, otrzymane mikrokapsułki poddano procesowi liofilizacji. Otrzymano zliofilizowane mikrokapsułki alginianowe o rozmiarach d = 10–500 mikrometrów zawierające Lactobacillus casei.

Stanowiąca przedmiot rozwiązania metoda otrzymywania mikrokapsułek, 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 mikrokapsułek o kontrolowanych rozmiarach od 10 do 500 mikrometrów. Opracowana technika wytwarzania mikrokapsułek 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 mikrokapsułek zawierających bakterie probiotyczne zamknięte wewnątrz kapsułki wytworzonej z polimeru naturalnego alginianiu 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_8–10_{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 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, 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 – przygotowywany 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.

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 mikrokapsułek 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.