

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» __ лютого 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» __ лютого 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології» та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Фармацевтична біотехнологія

на тему: Біотехнологія пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

КОСТЕНКО Костянтин Володимирович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОСТЕНКО Костянтина Володимировича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна, доц., к.б.н.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 914-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Weissella cibaria*; цільовий продукт: біомаса

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) _____

Розділ 1. Порбіотичні штами з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 2. Механізми гіпохолестеринемічної дії пробіотичних мікроорганізмів. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва пробіотику з гіпохолестеринемічним ефектом для лікарського засобу. Розділ 4. Обґрунтування стадій виділення та очищення, а також допоміжних речовин лікарського препарату з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях. Розділ 6. Специфікація обладнання виділення та очищення пробіотичної субстанції. Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення пробіотику для одержання оральної суспензії. Розділ 8. Контроль виробництва пробіотичної субстанції з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання оральних пробіотичних суспензій з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 10. Матбаланс на серію пробіотичної лікарської суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 11. Специфікація обладнання одержання пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом. Розділ 13. Опис пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення біомаси *Weissella cibaria* – по 1 аркушу листа формату A1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва лікарського засобу на основі біомаси *Weissella cibaria* – по 1 аркушу листа формату A1;

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Порбіотичні штами з гіпохолестеричним ефектом.	01.11.2023-10.11.2023	
2	Розділ 2. Механізми гіпохолестеринемічної дії пробіотичних мікроорганізмів.	11.11.2023-21.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва пробіотику з гіпохолестеринемічним ефектом для лікарського засобу.	22.11.2023-30.11.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування стадій виділення та очищення, а також допоміжних речовин лікарського препарату з гіпохолестеринемічним ефектом.	01.12.2023-10.12.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.	11.12.2023-15.12.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання виділення та очищення пробіотичної субстанції.	16.12.2023-20.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення пробіотику для одержання оральної суспензії.	21.12.2023-28.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль виробництва пробіотичної субстанції з гіпохолестеринемічним ефектом.	29.12.2023-04.01.2024	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання оральних пробіотичних суспензій з гіпохолестеринемічним ефектом.	05.01.2024-08.01.2024	
10	Розділ 10. Матбаланс на серію пробіотичної лікарської суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом.	09.01.2024-11.01.2024	
11	Розділ 11. Специфікація обладнання одержання пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом.	12.01.2024-15.01.2024	
12	Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом.	16.01.2024-17.01.2024	
13	Розділ 13. Опис пробіотичної суспензії з гіпохолестеринемічним ефектом згідно АНД	18.01.2024-20.01.2024	
14	Оформлення пояснювальної записки	18.01.2024-20.01.2024	
15	Оформлення графічної частини роботи	29.12.2023-20.01.2024	

Здобувач

(підпис)

Костянтин КОСТЕНКО

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Світлана СТАРОВОЙТОВА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана робота присвячена розробці пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічними властивостями. За основу було обрано молочнокислі бактерії *Weissella cibaria* SCCB2306, які здатні до асиміляції сироваткового холестерину $78 \pm 3\%$.

Серцево-судинні захворювання є основним і третім джерелом смертності в усьому світі. Гіперхолестеринемія є фактором ризику серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу та ін. Ризик серцевого нападу втричі вищий у пацієнтів з гіперхолестеринемією, ніж у тих, хто має нормальний вміст ліпідів у крові. Крім того, підвищення концентрації холестерину в сироватці крові на 1% призводить до збільшення частоти серцево-судинних захворювань на 2–3%, тому розробка пробіотиків з гіпохолестеринемічними властивостями є важливим питанням.

Наразі визначено, що основними препаратами для лікування атеросклерозу стерини та похідні фібринової кислоти, які мають купу побічних ефектів. Тому, було розроблено пробіотичний препарат, добова доза якого становить 1 мл. Тривалість курсу становить 5 тижнів. Запропоновано закривати 30% від загальної потреби України. Річна потреба в пробіотику становить $3,1 \text{ м}^3$, а кількість культуральної рідини з врахуванням втрат – $3,3 \text{ м}^3$.

Оскільки пропонується виготовляти рідкий препарат, було запропоновано технологію виділення та очищення, що передбачає відокремлення біомаси з її подальшою промивкою (зادля зменшення алергенів) та її розчиненням у стерильній знесоленій воді з додаванням глюкози та магнію стеарату з манітолом як стабілізатора та консерванту. Розчин препарату зберігають у збірнику при 4°C .

Робота складається зі вступу, 13 розділів та списку літератури, який містить 173 посилання. Кількість сторінок роботи – 126, кількість рисунків – 15 та кількість таблиць – 23. Графічна частина роботи представлена кресленнями технологічної та апаратурної схеми по 2 листи формату A1.

Ключові слова: холестерин, атеросклероз, серцево-судинні захворювання, пробіотики, гіпохолестеринемічний ефект, *Weissella cibaria* SCCB2306.

ABSTRACT

This work is devoted to the development of a probiotic preparation with hypocholesterolemic properties. The lactic acid bacteria *Weissella cibaria* SCCB2306, capable of assimilating serum cholesterol of $78 \pm 3\%$, was chosen as the basis.

Cardiovascular diseases are the main and third cause of death worldwide. Hypercholesterolemia is a risk factor for cardiovascular diseases, type 2 diabetes, etc. The risk of heart attack is three times higher in patients with hypercholesterolemia than in those with normal blood lipids. In addition, a 1% increase in serum cholesterol concentration leads to a 2–3% increase in the incidence of cardiovascular disease, so the development of probiotics with hypocholesterolemic properties is an important issue.

Currently, it has been determined that the main drugs for the treatment of atherosclerosis are sterols and derivatives of fibric acid, which have a lot of side effects. Therefore, a probiotic preparation was developed, the daily dose of which is 1 ml. The duration of the course is 5 weeks. It is proposed to close 30% of the total needs of Ukraine. The annual need for probiotics is 3.1 m³, and the amount of culture liquid, including losses, is 3.3 m³.

Since it is proposed to produce a liquid preparation, a separation and purification technology was proposed, which involves the separation of biomass with its subsequent washing (to reduce allergens) and its dissolution in sterile desalted water with the addition of glucose and magnesium stearate with mannitol as a stabilizer and preservative. The solution of the drug is stored in a collection at 4 °C.

The work consists of an introduction, 13 chapters and a list of references, which contains 173 references. The number of pages of the work is 126, the number of figures is 15, and the number of tables is 23. The graphic part of the work is represented by drawings of the technological and equipment scheme on 2 sheets of A1 format.

Key words: cholesterol, atherosclerosis, cardiovascular diseases, probiotics, hypocholesterolemic effect, *Weissella cibaria* SCCB2306.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ПРОБІОТИЧНІ ШТАМИ З ГІПОХОЛЕСТЕРИЧНИМ ЕФЕКТОМ.....	10
1.1. Молочнокислі бактерії.....	10
1.2. Дріжджі.....	17
1.3. Інші біологічні агенти.....	23
РОЗДІЛ 2. МЕХАНІЗМИ ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНОЇ ДІЇ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	33
2.1. Активність гідролази жовчних солей (BSH).....	34
2.2. Декон'югація жовчі через активність BSH.....	34
2.3. Засвоєння холестерину пробіотиками.....	36
2.4. Зв'язування холестерину з клітинною поверхнею пробіотиків.....	36
2.5. Співпреципітація холестерину з декон'югованими жовчними солями..	37
2.6. Перетворення холестерину на копростанол.....	38
ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ.....	39
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	40
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі пробіотичного штаму з гіпохолестеринемічним ефектом, галузей використання, потреби у лікарському засобі.....	40
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску гіпохолестеринемічного лікарського засобу.....	48
3.2.1. Обґрунтування форми випуску пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічним ефектом.....	48
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічним ефектом.....	50
3.3. Вибір пробіотичного штаму з гіпохолестеринемічним ефектом.....	56

3.4. Розрахунок потреби у пробіотику з гіпохолестеринемічним ефектом для випуску оральної суспензії у флаконах та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості пробіотику.....	59
---	----

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ, А ТАКОЖ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ.....	64
---	----

4.1. Обґрунтування відокремлення біомаси від супернатанту.....	64
4.2. Обґрунтування промивання біомаси.....	66
4.3. Обґрунтування додавання допоміжних речовин.....	67
4.4. Обґрунтування розчинення препарату для виготовлення рідкої форми.....	70

РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	71
---	----

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ.....	73
--	----

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИКУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ.....	75
---	----

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ	78
--	----

8.1. Визначення концентрації життєздатних клітин.....	78
8.2. Мікробіологічний контроль препарату.....	78
8.3. Визначення ступеня акумуляції холестерину.....	80
8.4. Визначення пробіотичних властивостей.....	81
8.4.1. Визначення кислотоутворювальної здатності.....	81
8.4.2. Визначення галактозидазної активності.....	82
8.4.3. Визначення адгезивної активності.....	82
8.4.4. Визначення протеолітичної активності.....	83
8.4.5. Визначення антагоністичної активності пробіотичних мікроорганізмів.....	84

8.4.6. Визначення стійкості пробіотичних мікроорганізмів до дії антибіотиків.....	85
8.5. Карти постадійного контролю.....	85
РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНИХ ПРОБІОТИЧНИХ СУСПЕНЗІЙ З ХІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ.....	90
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва пробіотичного препарату з хіпохолестеринемічним ефектом та кількості серій на рік.....	90
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	90
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	90
9.2.2. Підготовка персоналу.....	93
9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів.....	94
9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	96
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	98
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	98
РОЗДІЛ 10. МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ПРОБІОТИЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ.....	104
РОЗДІЛ 11. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ...	106
РОЗДІЛ 12. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ...	109
РОЗДІЛ 13. ОПИС ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ЗГІДНО АНД.....	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	127

ВСТУП

Атеросклероз є загальною патологічною основою для багатьох видів **серцево-судинних захворювань (ССЗ)**, де первинний прогноз передбачає запалення артерій, пов'язане з метаболічними змінами та ліпідами. Серцево-судинні захворювання є основним і третім джерелом смертності в усьому світі, відповідальним за 247,9 смертей на мільйон людей у 2013 році. Серцево-судинні захворювання спричиняють 28,2% усіх причин смерті та 84,5% смертей від серцево-судинних захворювань [1].

Згідно з повідомленням Всесвітньої організації охорони здоров'я, за оцінками, серцево-судинні захворювання стануть основним ризиком смертності, коли до 2030 року в усьому світі постраждає близько 23,6 мільйонів людей. Крім того, запалення аорти та інших периферичних кровоносних судин є менш поширеною проблемою зі здоров'ям, пов'язаною з атеросклерозом. Підвищений рівень холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), який змінює проникність клітин і динамічно впливає на кровоносні судини, прямо пов'язаний з атеросклерозом. Запальній відповіді сприяє субстрат, який змушує циркулюючі лейкоцити прилипати до поверхні ендотеліальних клітин. Це може призвести до подальшого приєднання молекул і детермінант, стимулюючи міграцію моноцитів до субендотеліальної області. Таким чином, моноцити дозрівають і перетворюються на піністі макрофаги, що містять поглинені частинки ліпідів, холестерин і вільні жирні кислоти, які багаті складними ефірами, які можуть наситити стінки артерій і згодом призвести до потовщення артеріальної стінки та підвищити ймовірність утворення ліпідного басейну до некротичного ураження. Імовірність того, що піністі макрофаги, які присутні в атеросклеротичній бляшці, лопнуть, є дуже високою, що може призвести до смертельного тромбозу [1,2].

Ця патологія пов'язана з важливими змінами в спосіб життя та режими

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Костенко К.В.</i>			<i>ВСТУП</i>		<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.В.</i>						<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>							7	127
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>	

харчування. Відсутність стратегій контролю ваги, на додаток до високого споживання цукру, жирів і натрію в щоденному раціоні, у поєднанні зі зниженням фізичних вправ — усе це призводить до нескінченних хвороб. Разом із інтенсивним курінням ці фактори сприяють та призводять до більшості істотних змінних факторів ризику, відповідальних за <50% усіх випадків смерті в усьому світі. Крім того, є також переконливі докази того, що певні дієти та способи життя пов'язані з атеросклеротичними ССЗ, наприклад, велике споживання соків із високим вмістом цукру та вина. На додаток до цих важливих чинників, винятково поширені фізіологічні та метаболічні зміни залучені до зростання смертності від атеросклеротичних ССЗ. Найпоширенішими є дисліпідемії, ожиріння, підвищений рівень глюкози, гіпертонія та інсулінорезистентність [1].

Пробіотики мають широке застосування, включаючи холестеринознижувальну дію при ССЗ, а точніше, атеросклерозі. Підвищений рівень холестерину ЛПНЩ є основним ризиком серцево-судинних захворювань. Агрегація холестерину ЛПНЩ у крові та судинах може спричинити гіпертензію та гіперліпідемію та, як наслідок, призвести до утворення атеросклеротичних уражень у кровоносних судинах. Різні мета-аналізи виявили вплив пробіотиків на рівень холестерину ЛПНЩ і загального холестерину в сироватці крові [1].

Гіпохолестеринемічний ефект пробіотиків залежить від виду та штаму з кількома гіпотетичними способами дії. Прийом пробіотиків може витягувати холестерин із кишечника шляхом включення в клітинну мембрану. В якості іншого механізму було також запропоновано, що пробіотики можуть перетворювати холестерин у копростанол, який потім виводиться з фекаліями, потенційно знижуючи всмоктування холестерину в кишечнику. Пробіотики молочної кислоти в йогурті, які синтезують високий рівень екзополісахаридів, можуть виводити з розчину вільний холестерин [1].

Протягом багатьох років деякі клінічні експерименти були успішно проведені на людях із застосуванням пробіотиків для контролю рівня ліпідів. Лікування такими препаратами призводило до зниження ЛПНЩ та покращення

рівня загального холестерину, холестерину ліпідів підвищеної щільності (ЛПВЩ) і тригліцеридів. На даний момент високоякісні випробування на людях продемонстрували потенціал кишкової мікробіоти в маніпулюванні та запобіганні або лікуванні захворювань. Наприклад, результати введення фруктану типу інуліну людям із ожирінням показали зменшення співвідношення талії/стегон і значне збільшення *Bifidobacterium* і *Faecalibacterium prausnitzii*, обидва з яких корелюють із значним зниженням ліпополісахаридів у сироватці. Крім того, було показано, що пробіотики здатні впливати на ліпідні профілі плазми у людей, особливо на рівні ЛПНЩ. Результати нутригеномного аналізу біопсії дванадцятипалої кишки після введення пробіотиків показали, що *Lactobacillus acidophilus* знижує рівень холестерину у людей [3].

Останні роки пробіотикам приділялося багато уваги через їх оголошену користь для здоров'я, включаючи потенціал зниження рівня холестерину. Зв'язок високого рівня холестерину з початком серцево-судинних захворювань був добре встановлений, і роль пробіотиків у зниженні підвищеного холестерину в сироватці була цілеспрямованою. Пробіотики допомагають знизити підвищений рівень холестерину як за рахунок фізіологічних процесів, так і на молекулярному рівні, посилюючи експресію генних продуктів і рецепторів, які беруть участь в утилізації та виведенні холестерину. Пробіотики, опосередковані кількома гіпохолестеринемічними механізмами, допомагають знизити фактори ризику ССЗ і подальшу глобальну смертність. Пробіотики надають широкий спектр переваг для здоров'я, включаючи гіпохолестеринемію у специфічному штаму. Пробіотики мають потужний потенціал для забезпечення природної та безпечної альтернативи фармакологічним підходам до лікування ССЗ [2].

А тому, актуальністю теми є виробництво пробіотичних препаратів в першу чергу для профілактики ССЗ, які можуть бути викликані високою концентрацією холестерину в організмі.

Новизною роботи є використання *Weissella cibaria* SCCB2306 для розробки препарату з гіпохолестеринемічним ефектом, який має ступінь акумуляції сироваткового холестерину в $78 \pm 3\%$ [4].

РОЗДІЛ 1

ПРОБІОТИЧНІ ШТАМИ З ГПХОЛЕСТЕРИЧНИМ ЕФЕКТОМ

1.1. Молочнокислі бактерії

Молочнокислі бактерії (LAB) є промислово важливими мікроорганізмами у всьому світі харчових продуктів різного плану. Крім того, LAB як пробіотики стали центром інтенсивних міжнародних досліджень щодо їх впливу на зміцнення здоров'я, який включає зниження рівня холестерину в сироватці крові, стимуляцію імунної відповіді, профілактику раку та полегшення діареї. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) прогнозує, що серцево-судинні захворювання залишаться основною причиною смерті до 2030 року, вражаючи приблизно 23,6 мільйонів людей у всьому світі. Підвищення рівня холестерину в сироватці крові сильно корелює з ішемічною хворобою серця. Таким чином, дослідники звертають пильну увагу на зниження холестерину ефектів LAB серед їх багатьох функціональних ефектів [5].

З кефіру було виділено 2 штами, Lp09 і Lp45, ідентифіковані як *Lactobacillus plantarum* за допомогою методів молекулярного типування. Ці штами продемонстрували чудову толерантність до низьких рівнів рН і високих концентрацій жовчних солей і показали потенційну активність гідролази, активність декон'югації жовчних солей і здатність до копреципітації холестерину. Потенційний ефект *L. plantarum* Lp09 і Lp45 на рівні холестерину в плазмі оцінювали на щурах Sprague-Dawley. Щурів у 3 групах лікування годували різними експериментальними дієтами: дієтою з високим вмістом холестерину, дієтою з високим вмістом холестерину плюс *L. plantarum* Lp09, або дієта з високим вмістом холестерину плюс *L. plantarum* Lp45 протягом 4 тижнів. Рівні загального холестерину, тригліцеридів і холестерину ліпопротеїнів низької щільності в сироватці крові, а також рівні холестерину і тригліцеридів у печінці були значно знижені у щурів, які отримували LAB, порівняно з контролем. Крім

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ПРОБІОТИЧНІ ШТАМИ З ГПХОЛЕСТЕРИЧНИМ ЕФЕКТОМ		
Розроб.	Костенко К.В.						
Перевір.	Старовойтова С.В.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						10	127

того, рівень фекального холестерину та рівня жовчних кислот були значно підвищені після введення LAB [6].

Різні ізоляти пробіотиків можна одержати з тваринних і рослинних джерел. Активність гідролази жовчних солей (BSH) і здатність до декон'югації жовчних кислот *Pediococcus acidilactici* NBHK002, *Bifidobacterium adolescentis* NBHK006, *L. rhamnosus* NBHK007 і *L. acidophilus* NBHK008 відзначаються як дуже високі. Концентрація холестерину визначали шляхом відготування хом'яків високохолестериною дієтою, з додаванням пробіотиків. NBHK007 зменшив секрецію загального холестерину на 100% після 48 год інкубації. Продукт PROBIO S-23 (поєднання вищенаведених штамів, крім NBHK008) викликав більше зниження загальної концентрації холестерину, ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів і тіобарбітурової кислоти в сироватці або печінці хом'яків з гіперхолестеринемією порівняно з хом'яками контрольної групи [7].

Було ідентифіковано дві молочнокислі бактерії з грудного молока людини. Штами *L. fermentum* показали різний ступінь профілю чутливості до антибіотиків клінічного виробництва. Штами МА-7 і МА-8 ніколи не втрачали своєї життєздатності при рН 2 і 3. *L. fermentum* МА-8 виявляв більшу стійкість до концентрації жовчі 0,3 і 1%, ніж штам МА-7. Штами показали високий відсоток аутоагрегації, що варіювався від 95 до 98%. Обидва ізоляти також продемонстрували гамма-гемолітичну активність. Холестеринознижувальна активність штамів МА-7 і МА-8 варіювалася від 34,84 до 91,15 %. Супернатанти продемонстрували вищу антихолестеринову активність порівняно з гранулами [8].

L. fermentum MJM60397 було ізольовано з коров'ячого молока. Штам MJM60397 був сприйнятливий до антибіотиків, і було встановлено, що він не є муцинолітичним і не гемолітичним, і не виробляє біоамінів. Крім того, MJM60397 переносив імітацію оро-шлунково-кишкових умов. MJM60397 також виявляв активність BSH і міг декон'югувати жовчні кислоти. Гіпохолестеринемічний ефект штаму MJM60397 вивчали на самцях мишей ICR з гіперхолестеринемією, спричиненою дієтою з високим вмістом жиру. Через 7 тижнів рівень загального холестерину та холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) значно

знизився в печінці мишей які в дієті отримували штаб MJM60397 порівняно з контролем. Загальний вміст жовчних кислот у калі був значно вищим у групі з пробіотиком. Ці результати показують, що гіпохолестеринемічний ефект штабу MJM60397 пояснюється його декон'югаційною активністю жовчних солей, що призвело до зниження всмоктування жовчних кислот і збільшення екскреції жовчних кислот з калом [9].

Визначено пробіотичний потенціал LAB, виділених із традиційно ферментованого південноіндійського кужа та корнішона (огірка). *L. crispatus* GI9 і *W. koreensis* FKI21 були здатні виживати при pH 2,0 і 0,50% жовчної солі протягом 3 годин, не втрачаючи своєї життєздатності. Усі штаби LAB виявляли інгібіторну активність щодо тест-культур патогенів (*Escherichia coli* MTCC 1089, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2642, *Staphylococcus aureus* MTCC 7443, *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7028, *Bacillus subtilis* MTCC 8561 та *Candida albicans* BS3) і були здатні декон'югувати жовчні солі. Вищу декон'югацію спостерігали в присутності глікохолату натрію. Продукція екзополісахариду штабами LAB коливалася від 68,39 до 127,12 мг/л. Крім того, GI9 і FKI21 продемонстрували зниження холестерину за допомогою солей жовчі. Ступінь асиміляції становив 58,08 мг/мл та 56,25 мг/мл на 100 мг холестерину [10].

Три ізоляти *Lactobacillus*, ідентифіковані як *L. acidophilus* LA15, *L. plantarum* B23 і *L. kefir* D17, які показали стійкість до кислоти та жовчних солей, були виділені з тибетських кефірних зерен. Клітини штабів були чутливі до гентаміцину, еритроміцину та хлорамфеніколу та резистентні до ванкоміцину зі значеннями мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) 26 мкг/мл. Усі 3 штаби продемонстрували потенційну активність BSH, асиміляцію холестерину та здатність до копреципітації холестерину. Крім того, потенційний вплив цих штабів на рівень холестерину в плазмі оцінювали на щурах Sprague-Dawley (SD). Рівні загального холестерину, тригліцеридів і холестерину ліпопротеїнів низької щільності в сироватці крові були значно знижені у щурів, які отримували LAB, порівняно з щурами, яких годували дієтою з високим вмістом холестерину без добавок. Рівень фекального холестерину та рівні жовчних кислот були значно

підвищені після введення LAB. Кількість фекальних лактобактерій була значно вищою у групах лікування LAB, ніж у контрольних групах. Крім того, 3 штами були виявлені в тонкому кишечнику, товстій кишці та фекаліях щурів під час випробування з годуванням. Рівень бактерій залишався високим навіть після того, як введення LAB було припинено протягом 2 тижнів [11].

З грудного молока людини було виділено 6 штамів *Lactobacillus* spp. Штам НМІ68 виявився найбільш кислотостійким, а НМІ28 і НМІ74 були найбільш чутливими до кислоти. Штам НМІ118 не зростав при 0,5% і 1% концентрації жовчі через 5 годин, але *L. oris* НМІ68 і НМІ43 показали деяку толерантність до такої концентрації жовчі. *L. oris* НМІ68 продемонстрував стійкість до більшості антибіотиків, а також антагоністичну активність проти досліджуваних патогенів (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *C. albicans* ATCC 90028, *S. aureus* ATCC 25923 та *K. pneumonia* ATCC 13883). *L. oris* НМІ68 засвоює $61,05 \pm 0,05$ мг/мл холестерину з присутністю 0,3% жовчної солі, а без неї - $25,41 \pm 1,09$ мг/мл [12].

Чотири ізоляти *Enterococcus* (*E. durans* KLDS 6.0930 і 6.0933 та *E. faecalis* KLDS 6.0934 і 6.0935) були виділені з традиційних вершків природного бродіння в Китаї. Усі чотири штами продемонстрували потенційну асиміляцію холестерину, декон'югацію солей жовчних кислот та/або деградацію холестерину. Потенційний вплив *E. durans* KLDS 6.0930 на рівні холестерину в сироватці крові оцінювали на щурах Sprague-Dawley. Після 4 тижнів аналізу відзначалось значне зниження рівня загального холестерину та холестерину ЛПНЩ в сироватці крові щурів, які отримували KLDS 6,0930. Крім того, загальний рівень жовчних кислот у калі був значно підвищений після введення пробіотику [13].

P. pentosaceus KID7 було ізольовано з ферментованої пшоняної каші. Штам мав толерантність до оро-шлунково-кишкового середовища та антимікробну активність. KID7 демонстрував активність BHS і холестерин-знижувальну активність *in vitro*. *In vivo* холестерин-знижувальна активність KID7 була досліджена на мишах з гіперхолестеринемією, яких годували атерогенною дієтою. Піддослідними тваринами виступали миші C57BL/6J. Рівень загального

холестерину в сироватці крові значно знизився на 19,8% у групі яка приймала пробіотик. Рівень холестерину ЛПНЩ знизився на 35,5. Аналіз експресії генів, пов'язаних з метаболізмом ліпідів у печінці, показав, що експресія мРНК рецептора ліпопротеїнів низької щільності (LDLR), холестерин-7 α -гідроксилази (CYP7A1) і аполіпопротеїну Е (APOE) була значно підвищеною в групі яка отримувала пробіотик. Крім того, KID7 продемонстрував бажану життєздатність під час сублімаційної сушки та подальших умов зберігання з поєднанням знежиреного молока та галактоманнану [14].

Бактерія *L. reuteri* LR6, ізолят з фекалій немовлят, показала позитивний результат на толерантність до жовчі та активність гідролази жовчних солей. Він також був оцінений як потенційний пробіотик із ефектом зниження рівня холестерину *in vivo*. Антихолестеричний ефект перевіряли на щурах-альбіносах. Порівняно з контрольною групою значення загального холестерину (ТС), тригліцеридів (ТГ) і ЛПНЩ були значно знижені в групі, яку годували *L. reuteri* LR6, але для ЛПВЩ ця різниця не була значною [15].

Зерна індонезійського кефіру є потенційним джерелом LAB, які можуть діяти як пробіотики зі специфічними функціональними властивостями. Результати показали, що 10 ізолятів продемонстрували значну життєздатність при низькому рН і жовчній солі із загальним зменшенням кількості клітин на $\sim 3 \log$ КУО/мл після впливу рН 2,5 і 0,5% (мас./об.) жовчної солі протягом 1 і 3 годин, відповідно. Усі штами виявляли сильну антимікробну активність проти патогенних бактерій і були чутливими до широкого спектру антибіотиків, але виявляли слабку активність гідролази жовчних солей. Ідентифікація на основі 16S РНК показала, що дев'ять ізолятів були *L. kefir*, а один – *L. rhamnosus*. Здатність ізолятів знижувати рівень холестерину в середовищі змінювалася в діапазоні від 22,08% до 68,75%, причому найбільше зниження показало *L. kefir* JK17. Здатність видаляти холестерин із середовищ значно зменшилася в клітинах у стані спокою та мертвих клітинах, коливаючись від 14,58% до 22,08% у клітинах у стані спокою та від 7,89% до 18,17% у мертвих клітинах [16].

L. casei LA-1, виділений з немолочного ферментованого джерела, показав позитивний результат тесту на декон'югацію жовчних солей по відношенню до видалення холестерину. Було виявлено, що перевірені фізіологічні змінні, пов'язані з ростом, такі як рН, температура та розмір інокулята, мають значний вплив на зниження рівня холестерину *in vitro* та виробництво біомаси *L. casei* LA-1. Максимальне зниження холестерину становило 45%, тоді як максимальний вихід біомаси 2,34 оптичної щільності (OD₆₀₀) спостерігався в центральній точці. Описані результати можуть вказувати на те, що ріст *L. casei* LA-1 залежить від його здатності виводити холестерин [17].

L. rhamnosus BFE5264 було виділеного з ферментованого молока Масаї. Модель миші, яка отримувала дієту з високим вмістом холестерину, слугувала моделлю для оцінки її функціональності. Введення *L. rhamnosus* BFE5264 призвело до значного зниження рівня холестерину в сироватці крові, що супроводжувалося змінами кишкової мікробіоти та продукуванням коротколанцюгових жирних кислот порівняно з контрольною групою. Цей штам також сприятливо вплинув на регуляцію метаболізму холестерину в печінці за схемою, подібною до тієї, що є результатом лікування статинами, препаратом, що пригнічує біосинтез холестерину в печінці [18].

Також, відомі випадки перевірки асиміляції холестерину вже відомих комерційних штамів LAB, *L. acidophilus* один із них. Як біологічну модель використовували курей-несучок. Результати досліджень показують, що плазмові тригліцериди, ЛПНЩ і загальний холестерин стали меншими, порівняно з контролем. Крім того, відбулося значне зниження рівня холестерину в печінці та яєчному жовтку за допомогою добавок *L. acidophilus*. Більше того, імунологічні параметри, включаючи титр антитіл проти еритроцитів барана, фітогемаглютинін (РНА)-тест на набухання та проліферацію Т- та В-лімфоцитів, були покращені у курей-несучок, які отримували *L. acidophilus*, порівняно з контрольними курками. У той час як співвідношення гетерофілів до лімфоцитів (H/L) зменшувалося з добавкою *L. acidophilus*, що вказує на низький рівень стресу у оброблених курей. Ці позитивні ефекти для *L. acidophilus* в подальшому відобразилися на

продуктивності курей-несучок і покращили несучість, масу яєць, масу яєць та ефективність корму [19].

Штами *L. helveticus* КН13 та КН11 було виділено із ферментованого коров'ячого молока. Штами показали толерантність до симуляції стану ротової порожнини та антимікробну активність. Обидва штами *L. helveticus* продукували біоактивні трипептиди, ізoleyцилпролілпролін і валілпролілпролін, під час ферментації молока. КН13 продемонстрував вищу холестерин-знижувальну активність *in vitro* (47%) порівняно з КН11 (28%), тому його було обрано для *in vivo* дослідження холестеринознижувальної активності при атерогенній дієті мишей з гіперхолестеринемією. Рівень загального холестерину в сироватці крові значно знизився на 8,6% у групі, що споживала пробіотик, відповідно, порівняно з контролем. Рівень холестерину ЛПНЩ знизився на 13%. Аналіз експресії генів, пов'язаних з метаболізмом холестерину, у печінці мишей показав підвищену експресію генів LDLR і SREBF2 у мишей, яких годували пробіотичною культурою [20].

L. pentosus KF923750 виділено з молочної машини та охарактеризовано як пробіотик. Відсоток виживання *L. pentosus* KF923750 становив 100% при pH 3, і 52,18% при pH 2. Подібним чином, цей штам виявився стійким до жовчі. Крім того, *L. pentosus* KF923750 контролює ріст *E. coli* ATCC 25922 і *S. aureus* ATCC 25923 шляхом виробництва бактеріоциноподібної інгібіторної речовини та антиадгезивних властивостей. *L. pentosus* KF923750 був чутливим до деяких антибіотиків. Порівняно з кроликами, яких годували дієтою з високим вмістом холестерину, але без добавок *L. pentosus* KF923750, рівень загального холестерину в плазмі крові, холестерину ЛПНЩ та тригліцеридів були значно знижені у кроликів, яких годували *L. pentosus* KF923750 на 11,54, 16,00 і 18,00% відповідно, без істотних змін рівня холестерину ЛПВЩ. Гістологічні зрізи печінки виявили ураження у всіх кроликів, яких годували дієтою з високим вмістом холестерину, але вони були менш вираженими у кроликів, які споживали *L. pentosus* KF923750 [21].

Було виділено декілька штамів *E. faecium* з пробіотичними властивостями з ґрунту. Всі штами були здатні виживати в суворих умовах шлунково-кишкового тракту і не містили жодного з генів вірулентності. Штам *E. faecium* LR13 продемонстрував чудову здатність до видалення холестерину та чутливість до ванкоміцину, а також володів більшістю бажаних і основних властивостей пробіотика [22].

E. faecium WEFA23 було виділено із здорового немовляти. Він має хорошу здатність холестерин ($1,89 \pm 0,07$ мг/ 10^{10} КУО). Безпека *E. faecium* WEFA23 була підтверджена гострим пероральним введенням мишам, і було виявлено, що він не має негативного впливу на загальний стан здоров'я. Крім того, було досліджено сприятливий вплив *E. faecium* WEFA23 на розсіяний склероз, спричинений дієтою з високим вмістом жиру, у щурів. Виявлено, що WEFA23 значно знижує масу тіла, рівень ліпідів у сироватці крові (загальний холестерин, триацилгліцерини та холестерин ЛПНЩ) [23].

Потенційний пробіотичний штам *L. paracasei* Jlus66 було виділено з натурального ферментованого молока. Визначення асиміляції холестерину було оціненено на моделях щурів. Порівняно з групою дієти з високим вмістом жиру, щури, яким вводили 4×10^{10} КУО/мл Jlus66, мали значно нижчий приріст маси тіла, рівень тригліцеридів, ЛПНЩ, а також амінотрансферази. Гістопатологічний аналіз показав, що Jlus66 також знижує рівень печінкових тригліцеридів і стеатоз [20].

В таблиці 1.1. показана характеристика пробіотичних штамів LAB з гіпохолестеричним ефектом.

1.2. Дріжджі

Були запропоновані різні механізми зниження ліпідів за допомогою пробіотиків, включаючи асиміляцію та включення холестерину в бактеріальні клітинні мембрани, зв'язування холестерину з поверхнями бактеріальних клітин і декон'югацію кишкових жовчних солей гідролазою бактеріальних жовчних солей. Дослідження *in vitro* показали, що декілька штамів *Lactobacillus* і *Lactococcus* можуть видаляти холестерин із культурального середовища. Подібно

Таблиця 1.1.

Пробіотичні LAB з гіпохолестеричним ефектом

Пробіотичний штам	Середовище для культивування, г/л	Умови культивування	Ступінь акумуляції холестерину, %	Джерело
<i>L. plantarum</i> EM	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2,	37 °С, 24 год, рН 6,8	88,12 ± 2,80	[5]
<i>W. halotolerans</i> F99	Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2 Волова жовч - 5	37 °С, 18 год	49	[25]
<i>L. plantarum</i> Lp09	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2,	37 °С, 16-18 год	33,3	[6]
<i>L. plantarum</i> Lp45	Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2 Глікохолат натрію – 2,93		33,9	
<i>P. acidilactici</i> NBHK002	Пептон – 10,	37 °С, 20 год	22	[7]
<i>B. adolescentis</i> NBHK006	Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10,		45	
<i>L. rhamnosus</i> NBHK007	Глюкоза – 20, КЗРО4- 2, Ацетат натрію – 5,		10	
<i>L. acidophilus</i> NBHK008	MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2, L-цистеїн – 0,5		5	

<i>L. fermentum</i> MA-8	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2, Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2	37 °С, 24 год	91,15	[8]
<i>L. fermentum</i> MA-7			34,84	
<i>L. acidophilus</i> LA15			10	
<i>L. plantarum</i> B23			20	[11]
<i>L. kefir</i> D17			25	
<i>L. oris</i> HMI68			2,541 ± 0,109	
<i>P. pentosaceus</i> KID7			19,8	[12]
<i>L. reuteri</i> LR6			68,19 ± 0,86	[14]
<i>L. kefir</i> JK17			68,75	[15]
<i>L. acidophilus</i>			10,5	[16]
<i>L. helveticus</i> KII13			47	[19]
<i>E. durans</i> KLDS 6.0930		37 °С, 18 год	56,61 ± 2,00	[20]
<i>L. fermentum</i> MJM60397		37 °С, 16 год	6,25	[13]
<i>L. rhamnosus</i> BFE5264			50	[9]
<i>L. crispatus</i> GI9	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2, Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2 Натрію таурохолат – 3,23	37 °С, 24 год	58,08	[18]
<i>W. koreensis</i> FKI21			56,25	

до бактеріальних штамів, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та *S. boulardii* можуть видаляти холестерин із лабораторного культурального середовища [26].

В дослідженні щодо гіпохолестеричного ефекту дріжджів приймали участь дванадцять учасників з гіперхолестеринемією. Учасники приймали $5,6 \times 10^{10}$ інкапсульованих колонієутворюючих одиниць (КУО) *S. boulardii* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079) двічі на день протягом 8 тижнів. Результати показали, що залишкові частинки ліпопротеїну зменшилися на 15,5% протягом 8-тижневого періоду. Решта вимірювань результатів суттєво не змінилася. Залишковий ліпопротеїн - це прогностичний біомаркер і потенційна терапевтична мішень у лікуванні та профілактиці ішемічної хвороби серця [26].

S. cerevisiae ARDMC1 було виділено з традиційної рисової пивної закваски. Дослідження було спрямовано на визначення його гіпохолестеринемічного впливу на щурів Вістар, яких годували дієтою з високим вмістом холестерину. Місцевий ізолят ARDMC1 продемонстрував потенційні пробіотичні характеристики, такі як толерантність до імітованих станів шлунково-кишкового стресу, аутоагрегаційні властивості та адгезію до лінії клітин Caco-2 кишкового епітелію. Крім того, ізолят ARDMC1 демонстрував властивості асиміляції холестерину *in vitro* в середовищах, доповнених холестерином. Введення пробіотичного ізоляту щурам, яких годували гіперхолестеринемічної дієтою, призвело до значного зниження загального холестерину в сироватці крові, холестерину ЛПНЩ та тригліцеридів наприкінці 42 днів [27].

Було визначено пробіотичні властивості *Saccharomyces* spp.Kb-5 і *Saccharomyces* spp.Kb-8. Тваринною моделлю виступали здорові качки чоловічої статі. Показники росту, характеристики туші та рівень холестерину в сироватці крові та м'ясі визначали у віці 56 днів качок. *Saccharomyces* spp.Kb-5 і *Saccharomyces* spp.Kb-8, а також інкомбінація, значно збільшили приріст живої маси та вагу туші, але не вплинули на кількість споживаного корму. Введення *Saccharomyces* spp.

призводить до значно нижчих концентрацій холестерину в сироватці та м'ясі порівняно з контролем [28].

Було виділено 4 культури дріжджів із гусениць *Pyrrharctia isabella*. Культури показали антимікробну активність та інші пробіотичні характеристики, такі як стійкість до рН, жовчі та температури. Лише 1 штамп міг витримувати високі концентрації NaCl (1,02 M) з виживаністю 80,32%. Культура CP-I показала активність гідролази солі жовчних кислот, а також чутливість до сульфатриду, пеніциліну-G, тетрацикліну та хлорамфеніколу. Цей ізолят продемонстрував потенціал зниження рівня холестерину на 9,16% в умовах *in vitro*. Молекулярна ідентифікація нового ізоляту показала, що він належить до *S. cerevisiae* з 97% генетичною подібністю [29].

Штам *Cryptococcus humicola* M5-2 має високу холестеринову засвоюваність і виділений із сиру. Як біологічну модель використовували щурів із дієтою, збагаченою холестерином. *C. humicola* M5-2 мали здатність засвоювати холестерин на рівні 73,33% у середовищах. Штам використовували у двох різних концентраціях у кормах для тварин (високі та низькі дози, що містять 2% та 0,1% ліофілізованих штамів відповідно). Коли порівнювали групи лікування, група, яка годувала низькою дозою, мала кращі результати. Рівень тригліцеридів та загального холестерину в сироватці крові знизився на 25% та 1,34% відповідно [30].

Було досліджено вплив зернової суміші, ферментованої пробіотиком *Pichia kudriavzevii* OG32, на маркери антиоксидантів у плазмі крові та ліпіди сироватки та печінки у щурів, яких годували дієтою з високим вмістом холестерину. Групи, які отримували дієту з високим вмістом холестерину, доповнену пробіотичною зерновою сумішшю, мали значно вищі рівні антиоксидантної активності в плазмі (еквівалент тролокса) і нижчі рівні загального холестерину, триацилгліцерину та холестерину ЛПНЩ у сироватці порівняно з контролем. Дієта з високим вмістом холестерину значно підвищила рівень загального холестерину та триацилгліцерину в печінці порівняно з групою негативного контролю, але доповнення дієти з високим

вмістом холестерину різними пропорціями ферментованої зернової суміші знизило рівень загального холестерину та триацилгліцерину в печінці [31].

Оливкова олія першого віджиму містить біотичну фракцію, представлену багатою мікробіотою, включаючи дріжджі. Одинадцять штамів дріжджів, що належать до видів *Candida adriatica*, *Candida diddensiae*, *Nakazawaea molendiniolei*, *Nakazawaea wickerhamii*, *Wickerhamomyces anomalus* і *Yamadazyma terventina* використовувалися в цьому дослідженні та порівнювалися з еталонними дріжджами *S. boulardii*. Нинішні дослідження показали, що на відміну від *S. boulardii*, які виробляють лише насичені та мононенасичені жирні кислоти, дріжджові штами оливкової олії також синтезують поліненасичені жирні кислоти у кількостях, більших, ніж ті, що містяться в оливковій олії, що забезпечує користь для здоров'я. Вживання в шлунковому та панкреатичному соках, що є важливим для пробіотичних дріжджів, оскільки дозволяє їм перетинати кишковий тракт людини, досягло максимуму 100%, коли дріжджові клітини були покриті оливковою олією. Холестерин було видалено 50% досліджених штамів дріжджів, і серед них найкращих результатів досягли штами 2032 і 2033 *W. anomalus* [32].

Десять штамів дріжджів було виділено з фруктових соків і піддано тестам *in vitro* для перевірки пробіотичної здатності. Три ізоляти показали вищу толерантність до рН і теплового стресу. На основі попереднього скринінгу ізоляти були піддані молекулярній ідентифікації та ідентифіковані як *W. anomalus* VIT-ASN01, *S. cerevisiae* VIT-ASN03 і *Yarrowia lipolytica* VIT-ASN04. Відібрані ізоляти дріжджів вижили та добре росли в умовах шлунково-кишкового тракту людини при рН 2,5 та 0,3% оксгаллу при 37°C. Антагоністичну активність дріжджових ізолятів перевіряли проти клінічних патогенів, а саме *S. typhii*, *B. subtilis* і *E. coli*. *W. anomalus* VIT-ASN01 продемонстрував максимальну толерантність до високої концентрації жовчних солей і кислотності, міг видаляти холестерин на 51,28% протягом 48 годин і виробляв 586,55 мг/л екзополісахариду [33].

Було визначено пробіотичні властивості *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03, а також оптимізовано середовище для його промислового культивування. Взаємодія між різними факторами, а саме концентрацією сахарози (1–3 %), концентрацією NaCl (2–4 %), рН (3–5), температури (20–30 °C) та інкубаційного період (20–40 діб) мають значний вплив на виробництво біомаси та екзополісахаридів. За оптимізованих умов було відмічено шестикратне збільшення продукції екзополісахаридів (4,87 г/л) *L. starkeyi* VIT-MN03. Штам продемонстрував хорошу самоадгезію (95%) і здатність до коагрегації (93%). Була також перевірена біосурфактантна активність (86%) і здатність пробіотичного екзополісахариду до видалення холестерину (90%). Екзополісахарид-зв'язані клітини *L. starkeyi* VIT-MN03 показали хорошу здатність зв'язувати мутагени [34].

Було виділено штам дріжджів із напою чайного гриба. *Starmerella davenportii* Do18 характеризувався наявністю певних пробіотичних властивостей. Результати показали, що штам дріжджів має здатність знижувати рівень холестерину на $45\% \pm 2\%$, вирощувався при температурі 37 °C і стійкий до рН 1,5, 2% жовчі та 40% розчину сахарози, міг виживати в імітованих середовищах шлунка та кишечника. Також було оцінено фізико-хімічні характеристики ферментованих напоїв, які показали, що дріжджі мають здатність знижувати рН і можуть виробляти органічні кислоти та леткі сполуки, такі як 2-фенілетанол. Ферментований напій також має високий загальний вміст фенолів і флавоноїдів і показав велику антиоксидантну та антимікробну дію [35].

В табл.1.2. показана низка пробіотичних штамів дріжджів з гіпохолестеричним ефектом.

1.3. Інші біологічні агенти

Через свою спороутворюючу природу пробіотичні штами *Bacillus* є стабільними при зберіганні та не потребують мікрокапсулювання чи охолодження під час транспортування, зберігання та розповсюдження на ринку. Повідомляється,

Таблиця 1.2.

Пробіотичні дріжджі, які володіють здатністю акумуляції холестерину

Пробіотичний штам	Середовище для культивування, г/л	Умови культивування	Ступінь акумуляції холестерину, %	Джерело
<i>C. humicola</i> M5-2	Дріжджой екстракт – 3, Пептон – 10, Глюкоза - 10	72 год, 30 °С	73,33	[30]
<i>S. cerevisiae</i> CP-I		48 год, 37 °С, рН 6,8	9,16	[31]
<i>S. davenportii</i> Do18	Дріжджой екстракт – 10, Пептон – 10, Глюкоза – 20, Волова жовч - 3	48 год, 37 °С,	45 ± 2	[35]
<i>W. anomalus</i> 2033	Дріжджовий екстракт – 3, Солодовий екстракт - 3, Соевий пептон – 2,5 Триптон – 2,5, Глюкоза - 10	120 год, 30 °С, рН 7,0	50	[32]
<i>W. anomalus</i> 2032				
<i>S. cerevisiae</i> ARDMC1	Дріжджовий екстракт – 3, Солодовий екстракт - 3, Пептон – 5, Глюкоза - 10	48 год, 30 °С	63,93	[27]
<i>W. anomalus</i> VIT-ASN01	Нарізана картопля – 300, Глюкоза – 20, Дріжджовий екстракт - 5	48 год, 28±2 °С	51,28	[33]
<i>L. starkeyi</i> VIT-MN03	Сахароза – 20, NaCl – 30, Глюкоза – 30, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,5, KH ₂ PO ₄ - 1, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5, NaCl – 0,1, CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,1	600 год, 25 °С, рН 4,0, 180 об/хв	90	[34]

що непатогенні штами *Bacillus* демонструють пробіотичний потенціал для людей і тварин [36].

Було оцінено *in vitro* холестерин-знижувальну активність пробіотичного штаму *B.coagulans* МТСС 5856. Цей пробіотик декон'югував жовчні солі та вивільнив дезоксихолеву кислоту, підтверджуючи його гідролазну активність жовчних солей. Крім того, *B. coagulans* МТСС 5856 також значно знижував рівень холестерину в культуральних середовищах в умовах вирощування (48,42%), у стані спокою (живий, але суспендований у буфері, 36,47%) і навіть убитий теплом (мертвий, 8,5%). *B. coagulans* МТСС 5856 значно знизив рівень холестерину в багатих на холестерин продуктах, таких як яєчний жовток (39,79%), куряча печінка (45,44%) і вершкове масло (49,51%), при інкубації протягом 24 годин в умовах, що імітують середовище *in vivo*. *B. coagulans* МТСС 5856 також виробляв значні кількості пропіонової кислоти та масляної кислоти під час бродіння продуктів, багатих на холестерин. Різноманітні способи, за допомогою яких *B. coagulans* МТСС 5856 знижує рівень холестерину, підтверджують його застосування у складі функціональних харчових продуктів і як дієтичного інгредієнта для лікування гіперхолестеринемії, потенційно знижуючи частоту ішемічної хвороби серця та інших пов'язаних з нею захворювань [36].

Було вивчено здатність трьох потенційних пробіотиків *Bacillus* spp., *B. flexus* МСС 2458, *B. flexus* МСС 2427 і *B. licheniformis* МСС 2514, видаляти холестерин. Усі три ізоляти були позбавлені ферменту гідролази жовчної солі, але вони все ще були здатні видаляти холестерин іншими механізмами. *B. flexus* МСС 2427 використовував холестериноксидазу (2,5 ОД/мл) для видалення холестерину, тоді як *B. flexus* МСС 2458 зазнав ко-преципітації в присутності жовчі. *B. licheniformis* МСС 2514 брав участь у засвоєнні холестерину, що також було підтверджено збільшенням вмісту насичених і ненасичених жирних кислот у клітинному ліпідному профілі. Цікаве спостереження полягало в тому, що безклітинний супернатант усіх трьох

ізолятів виявляв здатність знижувати холестерин і що всі були стабільними як при кислому, так і при лужному рН [37].

З шлунково-кишкового тракту курчат на вільному виході було виділено пробіотик *B. tequilensis* FR9. Цей штам зміг вижити в стимульованих кислотних і жовчних умовах і пригнічувати ріст патогенів. Зокрема, FR9 продемонстрував максимальне інгібування *L. monocytogenes*. Білковий аналіз Native-PAGE виявив наявність низькомолекулярного (3,4–5,0 кДа) антимікробного пептиду, який виявився субтилізином А. FR9 продемонстрував максимальну агрегаційну активність, продукцію екзополісахариду (85,46 мг/л) та асиміляцію холестерину ($63,12 \pm 0,05$ мкг/мл). Сильна властивість адгезії (12,6%) і здатність захисту від інвазії патогенів була виявлена *B. tequilensis* FR9 по відношенню до лінії клітин карциноми товстої кишки людини НСТ-116 [38].

Визначали безпечність та ефективність пробіотичних штамів *B. flexus* MCC2427 і *B. licheniformis* MCC2512 за допомогою досліджень *in vivo* на щурах-альбіносах Вістар. У аналізі щурам давали разову дозу 10^{10} КУО/мл пробіотиків. Результати показали нетоксичність вказаних штамів. ДНК-відбитки показали відсутність бактеріальної транслокації. Активність супероксиддисмутази та каталази вказує на їх антиоксидантний потенціал. Зниження рівня холестерину в сироватці з покращеним рівнем холестерину ЛПВЩ вказувало на здатність культур знижувати холестерин, що також було очевидним у підвищенні виділення холевої кислоти з калом. Обидві пробіотичні культури позитивно змінили кишкове мікробне середовище, збереження молочнокислий бактеріальний, і одночасно знижений патогенних штамів [39].

Було вивчено потенційний гіпохолестеринемічний ефект *Bacillus* sp. DU-106 у щурів з гіперхолестеринемією, а також досліджено його потенційний зв'язок із кишковою мікробіотою. Щури Sprague–Dawley отримували дієту з високим вмістом жиру або дієту з високим вмістом жиру, доповнену $7,5 \times 10^9$ та $1,5 \times 10^{10}$ КУО/кг маси тіла/день *Bacillus* sp. ДУ-106 (групи низьких і високих доз). Наприкінці 9

тижнів лікування *Bacillus* sp. DU-106 значно знизило масу тіла, печінковий індекс і загальний холестерин. Втручання *Bacillus* sp. DU-106 значно збільшило кількість бактерій і, зокрема, збільшило чисельність роду *Turicibacter*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas* і *Bacillus* і значно зменшило чисельність *Ralstonia*. Метаболомічні дані також показали, що додавання *Bacillus* sp. DU-106 помітно змінив метаболічні профілі кишечника щурів з гіперхолестеринемією і, зокрема, підвищив метаболіти індол-3-ацетату, метилянтарної кислоти, креатину, глутамінової кислоти, треоніну, лізину, аскорбінової кислоти та піридоксаміну. Добавка *Bacillus* sp. DU-106 зменшила гіперхолестеринемію, спричинену дієтою з високим вмістом жиру, і показала потенційні пробіотичні переваги для кишечника [40].

Було визначено вплив пробіотичного штаму *B. amyloliquefaciens* LFB112 на продуктивність росту, характеристики тушки, імунну відповідь і біохімічні параметри сироватки курчат-бройлерів Ross 308. Результати показали, що пробіотики підвищують масу тіла і середньодобовий приріст. Знизився рівень абдомінального жиру, добавка *B. amyloliquefaciens* LFB112 значно знизила рівень тригліцеридів, холестерину, сечовини та креатиніну в сироватці крові, одночасно збільшуючи рівень глюкози та загального білка [41].

B. coagulans B37 і *B. pumilus* B9 перевіряли на щурах-альбіносах Вістер. Дві експериментальні групи отримували холестеринемічний раціон плюс спорову біомасу *B. coagulans* B37 і *B. pumilus* B9 відповідно, суспендованих у стерилізованому знежиреному молоці при 8-9 log КУО/мл протягом наступних 21 дня. Контрольна група отримувала чисту воду разом із холестериновою дієтою протягом 21 дня. Пероральне введення як *B. coagulans* B37, так і *B. pumilus* B9 призвело до зниження рівня холестерину в плазмі крові, концентрації холестерину ЛПНЩ та індексу атерогенності в експериментальних щурів [42].

Відомі випадки виявлення нових властивостей вже у відомих препаратів. Прикладом може бути пробіотичний препарат Ензімспорин (до складу якого входять спороутворюючі бактерії *B. subtilis* B-2998D, B-3057D та *B. licheniformis* B-2999D).

Це препарат перевіряли на біохімічні, гематологічні, імунологічні показники, мікробіоту кишечника, та динаміка росту овець та ягнят. Добавка пробіотиків покращила приріст живої маси ягнят на 18,8%. Аналіз клінічних параметрів показав підвищення рівня загального білка, глобулінів і сечовини на 5,3%, 10,8% і 6,2% відповідно в крові ягнят, які отримували пробіотики. Подібним чином, збільшення загального білка, альбумінів і глобулінів спостерігалось в овець з додаванням Ензімспорину. Зниження рівня білірубину та холестерину в крові та підвищення бактерицидного та фагоцитарного індексів у овець та ягнят із добавкою пробіотиків свідчать про позитивний вплив Ензімспорину на функцію печінки та природну резистентність. Крім того, збільшення *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* і зменшення *E. coli*, *Enterococcus* і дріжджів у фекаліях піддослідних овець і ягнят вказує на потенціал Ензімспорину для підтримки хорошого здоров'я кишечника [43].

Пробіотична суміш, що складається з 5 різних *Bacillus* spp. (*B. sonorensis* JJY12-3, *B. paralicheniformis* JJY12-8, *B. sonorensis* JJY13-1, *B. sonorensis* JJY 13–3, та *B. sonorensis* JJY 13–8), які було ізолювано з соєвої пасту, захищає мишей від ожиріння, спричиненого дієтою з високим вмістом жиру та інших захворювань. Лікування пробіотиком *Bacillus* істотно послабило збільшення маси тіла та підвищило толерантність до глюкози. Крім того, лікування *Bacillus* значно зменшило стеатоз печінки. У мишей, які отримували *Bacillus*, печінкова експресія генів окислення ліпідів була значно збільшена, а накопичення ліпідів у підшкірній і мезентеріальній жировій тканині значно зменшилося [44].

Ще в одному дослідженні вивчали вплив включення в раціон пробіотиків на ріст, складові крові, мікрофлору клубової кишки та морфологію та гуморальний імунітет курчат-бройлерів Ross-308, які зазнали циклічного теплового. До складу пробіотичної суміші входили *B. bifidum* ATCC 29521, *L. acidophilus* CECT 4529, та *B. subtilis* DSM 17299, а також спори *B. subtilis* ATCC 35854. Результати показали, що дієтичні добавки покращили показники росту та зменшили абдомінальний жир у птахів, які перенесли тепловий стрес. Дієтичні добавки знижували сироваткові

концентрації холестерину, тригліцеридів і ЛПНЩ, тоді як рівень ЛПВЩ був підвищений. Кормові добавки зменшили підрахунок *E. coli* та загальної кількості кишкової палички в клубовій кишки, тоді як кількість *Lactobacillus* збільшилася [45].

Штами пробіотиків, такі як *B. clausii* і *B. megaterum* перевіряли на гіпохолестеричний ефект на щурах-альбіносах Sprague-Dawley. Результати показали зниження концентрації холестерину, тригліцеридів і ЛПНЩ і підвищення рівня ЛПВЩ порівняно з контрольною групою, яку заражали *Staphylococcus aureus*. Норми концентрації загального білка та альбуміну було зафіксовано (3,600 та 4,00) дЛ/г для груп з *S. aureus* порівняно з пробіотичною групою (*B. clausii* - 5,400 та *B. megaterum* - 4,80) дЛ/г [46].

Також, існують пробіотичні штами на основі грибів. *Monascus purpureus*, нитчастий гриб, відомий своєю ферментацією червоного дріжджового рису, виробляє метаболіт монаколін К, який використовується в статинах для пригнічення біосинтезу холестерину, проте біологічний агент має й інші механізми асиміляції холестерину. *M. purpureus* CBS 109.07 може асимілювати холестерин, видаляючи 36,38% холестерину після 48 годин інкубації при 37 °С. Видалення холестерину спочиваючим або мертвим *M. purpureus* CBS 109.07 не було істотним, зі зниженням холестерину в діапазоні від 2,75–9,27% протягом 72 годин інкубації. Також не було показано, що холестерин катаболізується як джерело вуглецю. Культури в стані спокою, перенесені з буфера на середовище для вирощування, змогли реактивуватися, і спостерігалось збільшення асиміляції та росту холестерину. Результати показують, що *M. purpureus* CBS 109.07 може знижувати вміст холестерину *in vitro* і може мати потенційне застосування в пробіотиках [47].

Нерідко пробіотики комбінують з іншими корисними речовинами. *Aspergillus awamori* перевіряли на курчатах. Як добавку використовували наночастинки селену. Були дві окермі групи, одну з яких годували основним раціоном з додаванням 0,05% *A. awamori*, а другу годували сумішшю *A. awamori* 0,05% + наночастинки селену 0,3%. Тригліцериди в плазмі та загальний холестерин були знижені при згодовуванні

A. awamori та комбінації *A. awamori* з наночастинками селену. Підвищився вміст жиру в м'язах грудей, що супроводжувалося зменшенням вмісту насичених жирних кислот і збільшенням вмісту ненасичених жирних кислот [48].

Також існують дослідження поєднання пробіотичного штаму *A. awamori* і LAB (*L. paracasei* ККР 824, *L. rhamnosus* ККР 825 та *L. rhamnosus* ККР 826). Цією сумішшю пробіотиків перевіряли ріст курей і якість яєць. Синергічні ефекти *A. awamori* та LAB спостерігалися на споживання корму, продуктивність яєць, загальну масу яєць та конверсію корму. Лікування не вплинуло на вагу та висоту жовтка та альбуміну, тоді як жир у жовтку, вага та товщина шкаралупи збільшувалися. З іншого боку, загальний холестерин у яєчному жовтку був синергічно знижений завдяки поєднанню. Рівень глюкози в сироватці крові, загального холестерину і тригліцеридів були знижені. І навпаки, сироваткова супероксиддисмутаза була синергетично збільшена комбінацією. Насичені жирні кислоти були знижені в той час як ненасичені жирні кислоти були збільшені в яєчному жовтку [49].

Rhizopus oryzae і *Chrysonilia crassa* — нитчасті гриби, виділені з клубової кишки місцевих індонезійських курей, які виявляють пробіотичні та антиоксидантні властивості. Перевіряли штами на бройлерах. За результатами, ЛПНЩ були вищими контролею групи з гіперхолестеричним харчуванням, ніж у птахів, які споживали гриби. Загальний рівень тригліцеридів був найнижчим у птахів що споживали *R. oryzae* [50].

В таблиці 1.3. показано пробіотичні штами з гіпохолестеричним ефектом, які не відносять до молочнокислих бактерій та дріжджів.

Таблиця 1.3.

Пробіотичні штами біологічних агентів, які володіють здатністю акумуляції холестерину

Пробіотичний штамп	Середовище для культивування, г/л	Умови культивування	Ступінь акумуляції холестерину, %	Джерело
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2, Ацетат натрію – 5,	18 год, 37 °С	48,42	[36]
<i>B. amyloliquefaciens</i> PUFSTP38	MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2, Волова жовч – 3, СаСО3 - 3	48 год, 30 °С	70,89	[51]
<i>B. licheniformis</i> MCC 2514	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl - 5	24 год, 37 °С	42,4	[37]
<i>B. flexus</i> MCC2427		16-18 год, 37 °С	25,6	[39]
<i>B. licheniformis</i> MCC2512			16,04	
<i>B. subtilis</i> DSM 32315			2,67	[52]
<i>B. subtilis</i> B10			0,92	[53]
<i>B. subtilis</i> Ch9		72 год, 37 °С	7,35	[54]
<i>B. tequilensis</i> FR9	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2,	24 год, 37 °С	42,08	[38]
<i>Bacillus</i> spp.	Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2		30	[55]

<i>M. purpureus</i> CBS 109.07	Солодовий екстракт – 20, Глюкоза – 20, Пептон - 10	72 год, 30 °С, 60 об/хв	36,38	[47]
<i>B. amyloliquefaciens</i> LFB112	Глюкоза - 10.0, L-глутамат натрію - 5.0, MgSO ₄ – 0,5, KCl – 0,78 KH ₂ PO ₄ – 1,0 FeSO ₄ – 0,00005, MnSO ₄ – 0,005, CuSO ₄ – 0,00016	24 год, 30 °С	8,68	[41]
<i>R. oryzae</i>	Глюкоза – 20, Нарізана картопля - 200	48 год, 38 °С	16,3	[50]
<i>C. crassa</i>			2,96	
<i>B. subtilis</i> ATCC19659	Яловичий екстракт – 5, Пептон – 3	14 год, 37 °С, 200 об/хв, рН 6,8	8,22	[56]

РОЗДІЛ 2

МЕХАНІЗМИ ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНОЇ ДІЇ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Хоча доступно достатньо доказів на основі досліджень *in vitro* та *in vivo*, які підтверджують гіпохолестеринемічний потенціал пробіотиків. Але точні механізми зниження рівня холестерину все ще невідомі і потребують більш глибоких досліджень. Потенціал пробіотиків щодо зниження холестерину визначається декількома складними та складними факторами, а саме: специфічні для штаму ефекти пробіотиків, дозування пробіотиків, метаболічний і ферментативний потенціал пробіотиків, носій (харчові матриці тощо) пробіотиків, життєздатна кількість і, перш за все, дискретна та специфічна фізіологія та метаболізм окремих хазяїв та їхня реакція на пробіотики опосередкована користь для здоров'я загалом і здатність знижувати рівень холестерину зокрема [1,2].

Деякі з добре вивчених механізмів зниження рівня холестерину включають дію гідролази жовчних солей (BSH), асиміляцію холестерину, декон'югацію солей жовчних кислот за допомогою активності BSH, зв'язування холестерину з клітинною поверхнею, співосадження холестерину з декон'югованими жовчними солями, включення холестерину в пробіотичні мембрани клітини, виробництво коротколанцюгових жирних кислот (SCFA) з харчових вуглеводів, перетворення холестерину в копростанол, видалення холестерину за допомогою пробіотичних метаболітів, таких як екзополісахариди (EPS), а також численні амінокислоти та пептидоглікан у пробіотичних клітинних стінках [2].

Додаткові вивчені гіпохолестеринемічні механізми включають стимуляцію печінкових X-рецепторів (LXR), які знижують експресію рецептора Німана-Піка С1-подібного 1 (NPC1L1), знижують регуляцію деяких ключових

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2 МЕХАНІЗМИ ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНОЇ ДІЇ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Костенко К.В.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.В.</i>					33	127
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

генів, залучених до біосинтезу холестерину в кишечнику, інгібування 3-гідрокси-3-метил-глутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктази, яка каталізує етап обмеження швидкості синтезу холестерину і підвищує регуляцію певних основних генів, залучених до зниження загального ліпідного профілю [57,58].

2.1. Активність гідролази жовчних солей (BSH)

Активність гідролази жовчних солей (BSH) Активність пробіотиків щодо гідролази жовчних солей (BSH) пов'язана з їхнім потенціалом зниження рівня холестерину через взаємодію з метаболізмом жовчних солей господаря. Активні пробіотики BSH мають перевагу для виживання та колонізації тонкої кишки, де відбувається кишково-печінковий цикл, і тому активність BSH також вважається важливим фактором колонізації [1,2].

Пробіотики зустрічають значну кількість кон'югованих жовчних солей у кишечнику ссавців, які, як припускають, пригнічують ріст бактерій через пряму антимікробну дію, активізацію захисту слизової оболонки хазяїна або синергетичну дію обох механізмів. Проте пробіотики, які мають активність BSH, можуть декон'югувати жовчні солі у вільні жовчні кислоти та амінокислоти, які зрештою виводяться з фекаліями [2,3].

Через фекальну екскрецію жовчних солей менша кількість жовчних солей транспортується назад у печінку за допомогою кишково-печінкової циркуляції. Дефіцит жовчних пластинок підвищує потребу в синтезі холестерину *de novo* в печінці. Таким чином, у печінці підвищується експресія рецептора ЛПНЩ, що призводить до збільшення печінкового захоплення ЛПНЩ, таким чином, концентрації ЛПНЩ і загального холестерину знижуються в кровообігу [2,3].

2.2. Декон'югація жовчі через активність BSH

Зниження рівня холестерину в сироватці вважається однією з ключових переваг споживання пробіотиків, і такі переваги можна віднести до ферментативної декон'югації жовчних кислот. Декон'юговані жовчні солі є найменш розчинними та менш ефективно реабсорбуються з просвіту кишечника

порівняно з їхніми кон'югованими аналогами. Крім того, вільні жовчні солі менш ефективні для емульгування, а отже, і всмоктування ліпідів у кишечнику [57].

Щоб підтримувати стабільний фізіологічний стан, жовчні солі, які вийшли з кишково-печінкової циркуляції, повинні бути замінені синтезом нових жовчних солей у печінці з використанням холестерину як попередника та, як наслідок, зниження рівня холестерину в сироватці крові [3]. Таким чином, декон'югація жовчних кислот призводить до гіпохолестеринемічних ефектів або через збільшення потреби в холестерині для синтезу жовчних кислот *de novo*, або через зниження розчинності холестерину і, таким чином, всмоктування холестерину всією поверхнею кишечника (рис.2.1). Кілька досліджень на тваринах і людях підтверджують, що потенціал пробіотиків для зниження рівня холестерину можна пояснити дією BSH на декон'югацію жовчних солей [2].

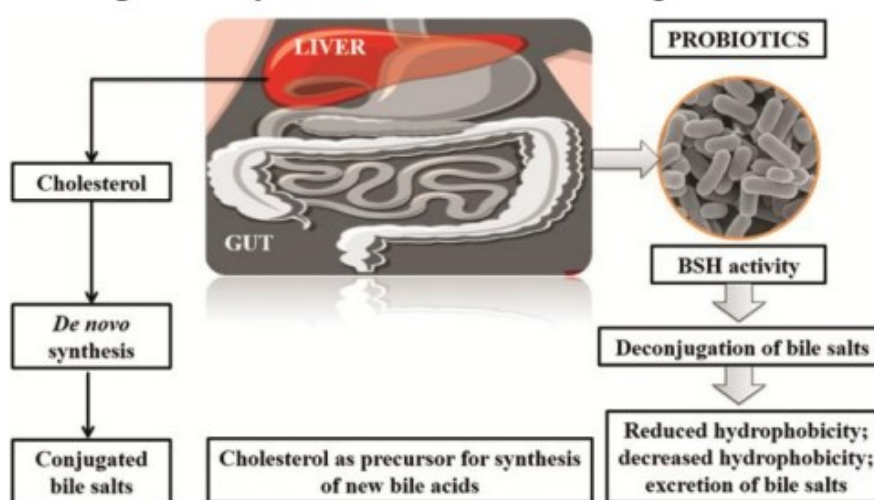


Рис.2.1. Гіпохолестеринемічні ефекти пробіотиків через декон'югацію жовчних солей [2]

Крім того, декон'юговані жовчні кислоти мають вищу спорідненість зв'язування з ядерними рецепторами, такими як фарсеноїдний X-рецептор (FXR), що призводить до пригнічення транскрипції холестерин-7-альфа-гідроксилази (7АН), ферменту, який каталізує синтез жовчних кислот із холестерину, тим самим впливаючи на синтез холестерину. Комплекс жовчна кислота–FXR утворюється шляхом зв'язування жовчних кислот з FXR, який, у свою чергу,

зв'язується з промоторною ділянкою гена *Cyp7a*, який відповідає за транскрипцію ферменту 7АН, що обмежує швидкість, що призводить до зниження синтезу жовчних кислот [56]. FXR- α специфічно активується жовчними кислотами, що викликає інгібування синтезу жовчних кислот і регуляцію ліпідів, а також глюкози та енергетичного обміну в хазяїні. Було виявлено, що активація рецептора FXR- α знижує рівень холестерину ЛПНЩ [1,2].

2.3. Засвоєння холестерину пробіотиками

Засвоєння холестерину в ШКТ дозволило б знизити всмоктування холестерину ентероцитами. Засвоєння холестерину вирощуванням пробіотичних клітин може зменшити холестерин, який легко доступний у кишечнику для всмоктування. Транскриптомний аналіз клітин *B. bifidum* PRL2010, вирощених у присутності холестерину, показав значне підвищення рівня транскрипції генів, що кодують передбачувані транспортери та редуктази, які можуть діяти під час асиміляції холестерину. В іншому дослідженні *L. acidophilus* ATCC 43121, вирощений у присутності міцел холестерину та жовчних солей, продемонстрував стійкість до лізису за допомогою обробки ультразвуком, що пояснюється зміцненням бактеріальних клітин через асиміляцію холестерину в клітинній мембрані [1,2].

2.4. Зв'язування холестерину з клітинною поверхнею пробіотиків

Холестерин може бути видалений пробіотичними клітинами шляхом зв'язування на їхніх клітинних поверхнях, таким чином роблячи холестерин недоступним для всмоктування, що призводить до гіпохолестеринемічних ефектів, а також може перешкоджати утворенню міцел холестерину в кишечнику (рис.2.2.) [2,3].

Для утворення міцел необхідні жовчні солі, фосфоліпіди та молекули холестерину, і будь-яка нестача холестерину може призвести до утворення порушених міцел, які можуть бути не в змозі транспортувати жирні кислоти до поверхні слизової оболонки кишечника для всмоктування, що призводить до зниження рівня холестерину. Крім того, холестерин, зв'язаний на поверхні клітин,

перешкоджає утворенню кишкових міцел холестерину, для чого потрібні вільні молекули холестерину на додаток до жовчних солей і фосфоліпідів. Адсорбція холестерину на пробіотичних поверхнях робить менше холестерину доступним для надходження в системний кровотік, що призводить до зниження рівня холестерину в сироватці крові [2].

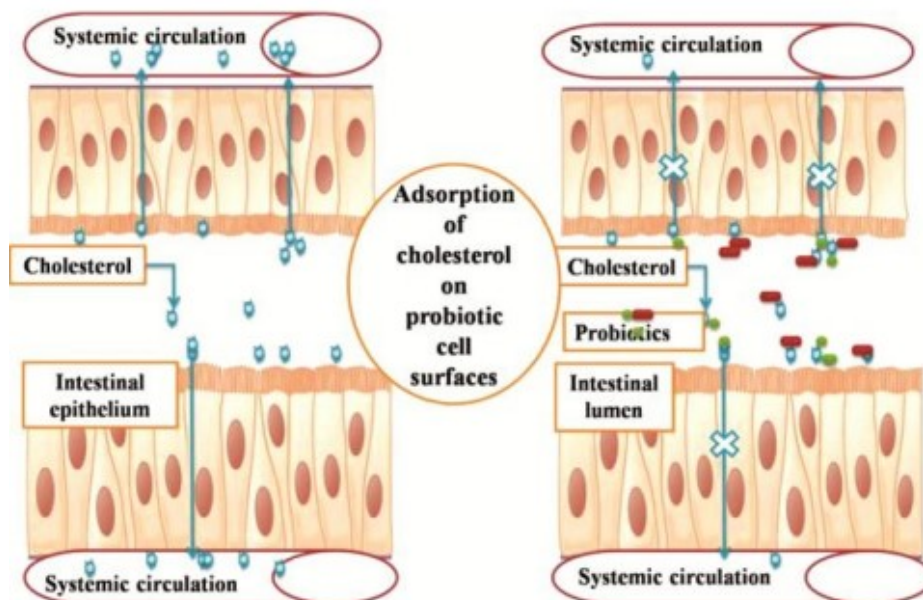


Рис.2.2. Гіпохолестеринемічний ефект через адсорбцію холестерину на поверхні клітин пробіотиків [2]

2.5. Співпреципітація холестерину з декон'югованими жовчними солями

Співпреципітація холестерину в присутності декон'югованих жовчних солей використовується пробіотиками для зниження холестерину. Холева кислота, що виділяється внаслідок декон'югації солей жовчних кислот, спричиняє зниження рН (<5,0), таким чином, призводячи до співосадження холестерину в кислому середовищі. Повідомлялося про сильну кореляцію між здатністю декон'югації штамів *Lactobacillus* та асиміляцією холестерину з міцел у їхні клітинні мембрани та співосадженням холестерину в присутності холевої кислоти. Інше дослідження підтвердило відповідну кореляцію між декон'югацією глікохолату/таурохолату та копреципітацією холестерину вибраними штамми *Lactobacillus* [1,2].

Ко-преципітація холестерину до 9% спостерігалася внаслідок дії обраних штамів *Lactobacillus*. Різні штами показали різний рівень копреципітації. Крім того, повідомляється, що ко-преципітація холестерину є основним фактором гіпохолестеринемічних ефектів через його залежність від низького рН (3,8–4,9), а холева кислота знаходиться у своїй протонованій формі (неіонізованій). Проте кишковий рН навряд чи буде нижчим за 6,0 [2].

2.6. Перетворення холестерину на копростанол

Як харчовий, так і ендогенний холестерин виводиться через кишковий відтік. У просвіті кишківника холестерин перетворюється на нерозчинну сполуку 5 β -копростанол (5 β -холестан-3 β -ол) і в незначній кількості копростанон. Такі метаболіти є менш розчинними, тому виявляють найменшу кишкову абсорбцію та виводяться з фекаліями, що призводить до зниження кишкової абсорбції холестерину [1,2].

Було проведено кілька досліджень, щоб дослідити можливий механізм перетворення холестерину в копростанол пробіотичними бактеріями. Наприклад, бактерії *Sterolibacterium denitrificans* виробляють холестериндегідрогеназу/ізомеразу, яка каталізує біогідрування холестерину до холест-4-ен-3-ону, проміжного кофактора в перетворенні холестерину в 5 β -холестан-3 β -ол [83]. Повідомлялося, що кілька пробіотичних ізолятів виробляють холестерин-редуктазу. Крім того, спостерігалася зниження рівня холестерину з поступовим підвищенням внутрішньоклітинних і позаклітинних рівнів копростанолу [2].

Транскриптомний аналіз *B. bifidum* PRL2010, вирощених у присутності холестерину, продемонстрував значне збільшення транскрипції генів, що кодують передбачувані транспортери та редуктази, які використовуються для асиміляції холестерину та його перетворення на копростанол. Подібним чином висока редуктазна активність пробіотика *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KDK411 був пов'язаний з підвищеною фекальною екскрецією копростанолу. Таким чином, перетворення холестерину в 5 β -холестан-3 β -ол може бути

причиною гіпохолестеринемічних ефектів, опосередкованих пробіотиками у пацієнтів з гіпохолестеринемією [2].

ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ

1. Наразі дослідження пробіотиків набирають нової популярності через їх універсальність та ефективність. Пробіотичні штами можна одержати як з організму людини чи тварини, так і з інших екологічних ніш.

2. Більша частина пробіотиків представлена різноманітними молочнокислими бактеріями. Цю групу можна вважати найбільшою за кількістю представників, які мають пробіотичні властивості. Окрім молочнокислих бактерій, пробіотичні властивості мають дріжджі, бацили і навіть деякі гриби.

3. Пробіотики з гіпохолестеринемічним ефектом – це дуже практичні препарати, оскільки дозволяють вирішити низку проблем, до яких можна віднести лікування та профілактику серцево-судинних захворювань, діабету (частіше другого типу), а також ожиріння.

4. Зручність застосування пробіотичних препаратів полягає в тому, що штами з корисними властивостями не обов'язково виготовляти у вигляді таблеток чи інших лікарських форм. Пробіотичні штами у великій кількості знаходяться в молочнокислих продуктах. Також, з пробіотиків можна створювати різні функціональні харчові продукти.

5. Щодо механізмів гіпохолестеринемічного ефекту відносять декілька можливих варіантів: дія BSH, асиміляція холестерину, декон'югація солей жовчних кислот, зв'язування холестерину з клітинною поверхнею, співосадження холестерину з декон'югованими жовчними солями, включення холестерину в пробіотичні мембрани клітини, перетворення холестерину в копростанол, видалення холестерину за допомогою пробіотичних метаболітів та інші. Зазвичай, вони працюють комбіновано, що тільки підсилює вказаний ефект.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі пробіотичного штаму з гіпохолестеринемічним ефектом, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Пробіотики здійснюють численні сприятливі впливи на здоров'я організму через опосередковані механізми, включаючи вплив на потенційні патогени, покращення бар'єрної функції кишківника, вироблення нейромедіаторів та імуномодуляцію. Однак спектр корисних для здоров'я пробіотиків швидко розширюється. Останні літературні дані показують, що ці препарати володіють гіпохолестеринемічним ефектом [2].

Гіперхолестеринемія є ключовим фактором прогресування атеросклерозу та серцево-судинних захворювань (ССЗ). Серцево-судинні захворювання є серйозною проблемою для громадської охорони здоров'я з високим рівнем смертності. Деякі з основних факторів, пов'язаних із ССЗ, включають генетику та спосіб життя. Дисліпідемія була одним із факторів, пов'язаних із виникненням кількох захворювань, пов'язаних із ССЗ. Декілька клініко-патологічних досліджень показали кореляцію між високим рівнем холестерину, особливо холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), і розвитком ССЗ [58].

Пробіотикам приділяється багато уваги через різноманітні корисні ефекти, особливо їх здатність знижувати рівень холестерину в крові людини. У кількох дослідженнях було показано, що пробіотики впливають на гіперхолестеринемію шляхом впливу на біосинтез холестерину. Результати застосування пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом є спірними та враховують різні параметри, такі як штам пробіотиків, частота дозування,

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Лім.	Арк.	Архивів
Перевір.		Старовойтова С.В.					40	127
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

терапевтична відповідь, зміни дієти тощо. Як наслідок, пробіотики мають схильність ставати дієтичними добавками для пацієнтів із помірною/тяжкою гіперхолестеринемією, що значно знижує ризик серцево-судинних захворювань [58].

Відповідно до зростаючих досліджень, було показано, що пробіотики знижують рівень ЛПНЩ і підвищують співвідношення ЛПНЩ/ЛПВЩ і знижують артеріальний тиск, запальні цитокіни, чутливість до інсуліну та індекс маси. Введення *Lactobacillus*, добре відомого пробіотика, може розглядатися як основний метод лікування ліпідознижувальних ефектів та інфекцій сечовивідних шляхів. Як допоміжний та додатковий лікарський засіб пробіотики часто додають до раціону для лікування метаболічних та кишкових захворювань. Пробіотичні бактерії *Bifidobacteria* і *Lactobacillus* можуть використовуватися як профілактичні або терапевтичні засоби для зниження рівня холестерину, кишкових патогенів і контролю метаболічних розладів у немовлят і дорослих. Кілька штамів *L. acidophilus*, *L. plantarum* і *Lactococcus lactis* призвели до зниження рівня холестерину в сироватці крові через їх здатність засвоювати холестерин, доступний *in vitro* [58].

Доступні препарати для зниження холестерину мають різні механізми дії. Статини пригнічують синтез холестерину в печінці та периферичних тканинах. Нещодавній мета-аналіз (14 досліджень за участю понад 90 000 пацієнтів протягом 5 років), показав, що статини знижують ризик серйозних серцево-судинних подій і загальну смертність. Проте інший мета-аналіз (11 досліджень) не показав зниження смертності при застосуванні статинів. Деякі дослідження наголошують, що статини мають вирішальне значення для пацієнтів саме із підвищеним серцево-судинним ризиком. Ймовірно, це пов'язано з побічними ефектами, пов'язаними з використанням цього класу препаратів, які включають міопатію та когнітивні порушення. Іншими фармакологічними агентами, які використовуються для лікування гіперхолестеринемії, є секвестранти жовчних кислот, інгібітори всмоктування холестерину, ніацин і фібрати. Тим не менш, ці препарати також пов'язані з багатьма побічними ефектами, які обмежують

дотримання режиму лікування, а також якість життя. Таким чином, слід виявити агенти, які можуть виявляти гіпохолестеринемічні ефекти без побічних ефектів [59].

Наявні клінічні дослідження щодо пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом показано в табл.3.1 (див. наступну сторінку).

З табл.3.1. можна зробити висновок про те, що клінічних даних щодо пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом ще недостатньо для їх можливого введення в лікарську практику. Можна припустити, що також, на ефективність роботи пробіотиків також впливає форма препарату.

Штами молочнокислих бактерій *Weissella cibaria* вважаються пробіотичними оскільки володіють більшістю властивостями пробіотичних штамів. Окремо відзначають їх стійкість до антибіотичних препаратів, а також до синтезу екзополісахаридів. *W. cibaria* визначають як бактерії гіперпродуцентів декстрану. Також вони зброджують молоко, утворюючи нові молочнокислі продукти. Ефективність цих препаратів було визначено на здоров'ї ротової порожнини людей, які мають схильність до постійних запалень парадонту. *W. cibaria* зняв запалення з проблемних ділянок та підтримував нормальний вміст мікрофлори порожнини рота [60-63].

W. cibaria — це коротколанцюгова грампозитивна молочнокисла бактерія. Це домінуючий вид у ферментованих продуктах, таких як кімчі. *W. cibaria* пригнічує оральні патогени і пригнічує леткі летючі сполуки сірки (VSC). Наприклад, *Fusobacterium nucleatum* не може продукувати VSC у присутності *W. cibaria*, оскільки ріст *F. nucleatum* пригнічується перекисом водню, що виробляється *W. cibaria* [63].

W. cibaria, як типовий пробіотик, скійкий до шлункового соку та жовчних солей, демонструючи рівень виживання 79,37 і 91,64% відповідно. Також, штами володіють й адгезивними властивостями. Рівень адгезії становить близько 18,45%. Штами стійкі до гентаміцину, канаміцину, стрептоміцину і ванкоміцину. Штами *W. cibaria* не володіють гемолітичною активністю. Здатні до синтезу β -глюкозидази

Таблиця 3.1.

Інтервенційні випробування на людях пробіотиків з впливом на сироватковий загальний холестерин та ліпопротеїди низької щільності [3]

Пробіотик або синбіотик	Група перевірки	Форма та метод	Результат
<i>L. reuteri</i> NCIMB 30242	127 чоловіків і жінок з гіперхолестеринемією	Капсули або капсули плацебо рандомізовані, подвійне сліпе, плацебо-контрольований, паралельний, багатоцентровий	Зниження рівня холестерину ЛПНЩ на 11,64% і ЗХ на 9,14% за 9 тижнів
	114 чоловіків і жінок з гіперхолестеринемією	Йогурт з мікрокапсульованими штамами, подвійне сліпе, плацебо-контрольований, паралельний, багатоцентровий	Зменшення на 8,92 і 4,81% холестерину ЛПНЩ і ЗХ, спостерігався через 6 тижнів
<i>L. acidophilus</i> La5 та <i>B. lactis</i> Bb12	60 хворих на цукровий діабет 2 типу	Ферментоване молоко в рандомізованому подвійному сліпому контролі	Зменшення ЗХ на 4,54% і холестерину ЛПНЩ на 7,45% через 6 тижнів
	90 жінок віком 19–49 років	Пробіотичний йогурт у рандомізованому дослідженні	Жодних змін ЗХ і ЛПНЩ після 6 тижнів
<i>E. faecium</i> і два штами <i>S. thermophilus</i>	Здорові чоловіки середнього віку	Ферментоване молоко в рандомізованому, подвійному сліпому та плацебо-контрольованому дослідженні	Зменшення ЗХ на 6% через падіння ЛПНЩ на 10% через 6 тижнів
	32 хворих (21 жінка та 11 чоловіків) віком 36–65 років	Кисломолочний продукт у рандомізованому, подвійному сліпому та плацебо-контрольованому дослідженні	Значне середнє зниження на 6,15% для холестерину ЛПНЩ і 5,3% для ЗХ через 8 тижнів
<i>L. acidophilus</i> і 2,5% фруктоолгосахаридів	30 нормальних здорових чоловіків віком 33–64 роки	Ферментоване молоко в рандомізованому плацебо-контрольованому подвійному сліпому двосторонньому перехресному дослідженні	Значення ЗХ і ЛПНЩ, зареєстровані через 3 тижні, були знижені на 4,4 і 5,4% відповідно
<i>L. acidophilus</i> та <i>B. lactis</i>	14 людей з легкою та помірною гіперхолестеринемією	Звичайний йогурт у рандомізованому та перехресному дослідженні	Через 6 тижнів спостерігалось значне зниження ЗХ у сироватці крові на 0,68 ммоль/л
<i>E. faecium</i>	По 425 жінок та чоловіків	Молочні продукти в рандомізованому контрольованому дослідженні	Значне зниження ЗХ на 4% і ЛПНЩ на 5% через 8 тижнів

Закінчення табл.3.1

<i>L. acidophilus</i> CHO-220 та інулін	32 чоловіки та жінки з гіперхолестеринемією	Чотири капсули синбіотика в рандомізованому, подвійному сліпому, плацебо-контрольованому та паралельно розробленому	Зниження ЗХ на 7,84% і ЛПНЩ на 9,27% через 12 тижнів
Два <i>S. thermophilus</i> і два штами <i>L. acidophilus</i>	70 здорових чоловіків (n = 20) і жінок (n = 50), віком 18–55 років, розділених на п'ять різних груп, серед яких три групи отримували пробіотики	Йогурт рандомізований, подвійний сліпий, плацебо-контрольований, паралельний аналіз	Без змін
Два штами <i>S. thermophilus</i> і один штаб <i>L. rhamnosus</i>			ЛПНЩ знизився на 8,4% через 8 тижнів
Один штаб <i>E. faecium</i> і два штами <i>S. thermophilus</i>			
<i>L. acidophilus</i> L1			3,2% зниження холестерину ЛПНЩ і 2,4% ЗХ через 4 тижні протягом першого періоду дослідження
<i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	60 із зайвою вагою, здорові дорослі, середній вік становив 49 років. Серед них дві групи по 15 добровольців отримували пробіотики та омега-3	Пробіотичні капсули в рандомізованих, плацебо-контрольованих дослідженнях	Зниження холестерину ЛПНЩ на 7,04% у групі пробіотиків і на 10,7% у групі омега-3 і пробіотиків, однак ЗХ збільшився на 6,7% у групі омега-3 і пробіотиків через 6 тижнів
<i>L. paracasei</i> LPC37	32 чоловіка і жінки	Пробіотичний напій у подвійному сліпому, плацебо-контрольованому, перехресному дослідженні	Значне зниження ЗХ і концентрації ЛПНЩ у плазмі через 4 тижні

та протеолітичних ферментів. Мають антагоністичну активність проти *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* та *Escherichia coli* (діаметр зони інгібування росту в залежності від патогену має 17,7–23,8 мм). Штами синтезують мурашину, пропіонову, молочну, оцтову та масляну кислоти. Штами також володіють антиоксидантними властивостями [64,65].

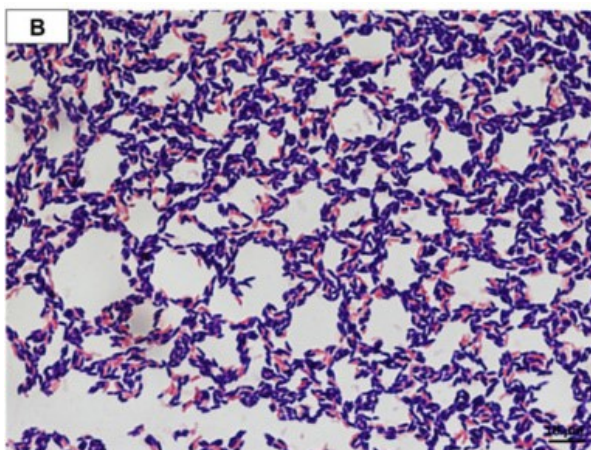


Рис.3.1. Клітини *W. cibaria* пофарбовані за Грамом [65]

Види *Weissella* часто зустрічаються в середовищах існування, пов'язаних з організмом людини або тварини, наприклад, у шлунково-кишковому тракті або в грудному молоці людини. Було виявлено, що *W. cibaria* присутній у всіх зразках фекалій здорових дорослих, але рідше у зразках фекалій пацієнтів із целиакією. *W. cibaria*, єдиний вид *Weissella*, який був описаний як умовно-патогенний мікроорганізм для людини. Штами *W. cibaria* здатні до синтезу бактеріоцинів, один з препаратів отримав назву Вейселліцин 110. Протизапальну активність *W. cibaria in vitro*, яка полягала в інгібуванні вироблення інтерлейкіну (IL)-6 та IL-8 епітеліальними клітинами порожнини рота людини, також можна було продемонструвати, ще раз підкреслюючи високий пробіотичний потенціал *W. cibaria* [66].

W. cibaria може рости при 15 і 45°C, але не при 4°C (Björkroth et al., 2002). Бактерії переносять присутність 6,5% NaCl. Штами *W. cibaria* гідролізують аргінін і виробляють як d, так і l енантіомер молочної кислоти як кінцевий

продукт ферментації глюкози. CO₂ також утворюється в результаті метаболізму глюкози. Кислота утворюється з арабінози, целобіози, саліцину, сахарози та ксилози, але не з галактози, лактози, мелібіози, рафінози, рибози та трегалози. Декстран утворюється з сахарози. Вміст гіаніну+цитозину у ДНК становить 44–45% [66].

Незважаючи на те, що *W. cibaria* вважається умовно-патогенним, його безпечність перевіряли на щурах. Попередні дослідження показали, що *W. cibaria* вважається безпечним на основі результатів аналізів *in silico* та *in vitro*. Оцінка токсикологічної безпеки *W. cibaria* була проведена за допомогою дослідження безпечності перорального застосування у щурів, 14-денного дослідження орального діпазону, наступного 13-тижневого дослідження пероральної токсичності на щурах та батареї генетичної токсичності (бактеріальна зворотна мутація *in vitro*, хромосомна аберація *in vitro* в клітинах яєчника китайського хом'яка та дослідження мікроядра *in vivo* на мишах). Результати досліджень на щурах показали, що гостра летальна доза *W. cibaria* становить > 5000 мг/кг маси тіла/день ($>1,8 \times 10^9$ КУО/кг/день) і 14-денний або 13-тижневий рівень без спостережуваних побічних ефектів становить 5000 мг/кг маси тіла/день ($1,8 \times 10^9$ КУО/кг маси тіла/день), найвища доза, що вводиться. *W. cibaria* не виявилася мутагенною в тесті на бактеріальну зворотну мутацію та некластогенною або анеугенною *in vitro* та *in vivo*. Проведені токсикологічні дослідження показали, що *W. cibaria* є безпечним мікроорганізмом для споживання [67,68].

Більшість штамів *W. cibaria* демонструють також гіпохолестеринемічний ефект [69,70]. Штам *W. cibaria* SCCB2306 має високий гіпохолестеринемічний ефект, який виражається як асиміляція $78 \pm 3\%$ сироваткового холестерину [4]. Через що, пропонується розробити відповідний пробіотичний препарат на основі даного штаму. Але для подальшої розробки варто визначити форму випуску препарату.

Обсяг світового ринку пробіотиків у 2020 році оцінювався в 34,1 мільярда доларів США, а до 2030 року, за прогнозами, досягне 73,9 мільярда доларів США, зареєструвавши CAGR (складний річний приріст) 8,6% [71].

Зростання занепокоєння здоров'ям і зростання обізнаності споживачів підвищили споживчий попит на пробіотики, що призвело до збільшення пробіотиків у молочних і харчових продуктах. Окрім доступних медичних добавок для здоров'я, споживачі віддають перевагу пробіотичним молочним продуктам, таким як йогурт, морозиво та сир, щоб споживати корисні бактерії [71].

Одним із сучасних трендів ринку є використання штамів пробіотиків стрептококів у збагаченні кормів для тварин. Знижує ризик захворювання тварин на віспу та туберкульоз. Крім того, пробіотики все частіше використовуються у виробництві добавок для лікування різних запальних захворювань шкіри, таких як атопічний дерматит та екзема. Очікується, що всі ці фактори сприятимуть зростанню ринку пробіотиків [71].

Згідно з аналізом ринку пробіотиків, ринок сегментований на основі інгредієнта, функції, застосування, кінцевого споживача та регіону. Залежно від інгредієнтів його поділяють на бактерії та дріжджі. На основі функції ринок пробіотиків розділений на звичайну, профілактичну та терапевтичну медичну допомогу. Відповідно до застосування, він поділяється на продукти харчування та напої, дієтичні добавки та корми для тварин. Відповідно до кінцевого користувача, він розділений на людину та тварину [71].

За інгредієнтами сегмент бактерій отримав найбільшу частку ринку пробіотиків у 2020 році завдяки стрімкому попиту на пробіотичні харчові продукти, отримані з бактерій. Виходячи з функцій, сегмент профілактичних медичних послуг очолив ринок з найвищою часткою ринку згідно з прогнозом ринку пробіотиків. Це пояснюється зростанням проблем зі здоров'ям (особливо підвищенням ризику ССЗ), які спонукали інвесторів вкладати в дослідження та розробки та випускати нові та інноваційні пробіотичні продукти [71].

Можна зробити висновок, що ринок пробіотиків в подальшому буде лише зростати, оскільки сучасні дослідження щороку відкривають нові їх корисні властивості для людей та тварин, що викликає все більший інтерес. З врахуванням того, що статистика ССЗ щороку лише збільшується, інвестування в клінічні дослідження пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом є очевидною, а отже і є в них нагальна потреба. Виявлення випадків серцево-судинних захворювань майже подвоїлося з 271 мільйона в 1990 році до 523 мільйонів у 2019 році, а кількість смертей від серцево-судинних захворювань неухильно збільшувалася з 12,1 мільйона в 1990 році до 18,6 мільйона у 2019 році [72].

3.2 Обґрунтування вибору форми випуску гіпохолестеринемічного лікарського засобу

3.2.1. Обґрунтування форми випуску пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічним ефектом

За формою випуску пробіотики діляться на дві групи - рідкі та сухі. Сухі пробіотики - це ліофілізовані мікроорганізми, які можуть перебувати у порошку, капсулах, таблетках. Термін зберігання сухих препаратів більш тривалий, ніж рідких, до того ж вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і, таким чином, не вимагають суворого дотримання критеріїв зберігання. Тому багато фірм, особливо зарубіжних, вважають доцільним виробляти саме сухі пробіотики, які також набагато зручніші і в транспортуванні [73].

В даний час сухі пробіотики випускаються в таких формах: ліофілізована біомаса у флаконах або ампулах, ліофілізована біомаса в желатинових капсулах, ректальні та вагінальні супозиторії з ліофілізованої біомаси, ліофілізована біомаса, спресована в таблетки, покриті речовинами, розчинними в кишковій мембрані, лінгвальні таблетки, які розчиняються під язиком [73].

Проте ліофілізовані форми пробіотика мають ряд недоліків, серед яких тривале вивільнення мікробних клітин зі стану анабіозу (8-10 годин в оптимальних умовах культивування, чого можна досягти лише в лабораторії). У шлунково-кишковому тракті (ШКТ) протягом цього періоду часу велика частина

пробіотичних клітин може елімінуватися, не активуючись. Тому виробництво пробіотиків у сухому вигляді більше пов'язане з бізнес-інтересами виробників, ніж із забезпеченням високоякісної продукції. У людини значна частина ліофілізованих мікроорганізмів гине перед реактивацією в суворих умовах ШКТ [73,74].

Набагато ефективніше «живі» пробіотики у вигляді рідкої суспензії в спеціальному захисному середовищі. Рідкі пробіотики - це бактерії «з активною життєвою позицією», тобто вони зберігають всі свої цінні властивості і починають діяти відразу ж після потрапляння в організм. У цих препаратах бактерії знаходяться в фізіологічно активній формі і можуть діяти відразу після прийому. Пробіотичні мікроорганізми в рідкій формі активні, життєздатні в жорстких умовах ШКТ, не потребують тривалої реактивації, проявляючи свою дію при попаданні в організм. Крім того, ця форма пробіотиків найкраще підходить для дітей [73,74].

Більшість дослідників вважають, що краще у складі пробіотиків застосовувати живі культури мікроорганізмів. Проте, по-перше, це вимагає суворого дотримання умов придатності, по-друге, термін зберігання у зазначених препаратах коротший за ліофілізовані аналоги – не більше трьох місяців [73].

Рідкі пробіотики можуть складатися з [73]:

- бактерій, які знаходяться у фізіологічно активному стані;
- спеціального живильного середовища, що служить джерелом живлення фізіологічно активних бактерій;
- додатково введених інгредієнтів, які підсилюють ефективність препарату (водорозчинні вітаміни, мікро- і макроелементи, амінокислоти тощо);
- метаболітів (продукти життєдіяльності бактерій).

Рідка форма відкриває можливості введення пробіотичних препаратів різними шляхами (вагінально, перорально, інтраназально, ректально тощо). Також вони можуть бути використані при полосканні ротової порожнини, їх можливо

наносити на шкіру і на волосяну частину голови, в залежності від необхідності відновлення мікроекології різних біологічних ніш [73].

Рідкі пробіотики бувають різних форм, у тому числі; пробіотичні рідкі добавки, йогуртові напої та більш традиційні ферментовані напої, такі як кефір і чайний гриб [75]. З цього виходить ще одна перевага рідких пробіотиків, яка полягає в тому, що рідкі пробіотики можуть бути більш універсальними у своєму застосуванні. Їх можна додавати в смузі, соки або навіть воду, щоб легше включити їх у свій розпорядок дня [76].

На українському ринку пакування рідких пробіотиків представлено у вигляді крапель, суспензій та флаконів. В загальному, краплі використовуються для прийому пробіотиків малолітніми дітьми, що є зручною формою для матерів та татусів, оскільки краплі вводяться через ротову порожнину. Флакони подібні до крапель, але мають більший об'єм та містять пластиковий крапельний дозатор, в той час, як краплі зазвичай містять дозатор піпеткового типу. Флакони виробляють як для малюків, так і для дорослих людей. Суспензію випускають в спеціальних первинних пластикових упаковках на 5 мл. У виробників ту виникає розбіжність, оскільки деякі іменують цю упаковку пластиковим флаконом, а інші – пластиковою ампулою. Такі препарати мають більшу перевагу, перед іншими рідкими формами, оскільки пробіотики у вигляді крапель та флаконів з дозатором зазвичай виробляються в склі, яке легко може розбитись. А тому, найліпшою формою варто вважати оральні суспензії, які пакуються в пластикові ампули/флакони [77,78].

Отже, з врахуванням усіх переваг та недоліків пропонується розробити рідкий препарат у вигляді оральної суспензії в пластикових флаконах/ампулах, оскільки він є більш ефективним, а також через те, що після сушіння препарату активність культури втрачається і неможливо точно передбачити на скільки сильно знизиться кількість життєздатність клітин. Це визначається експериментальним шляхом із застосуванням різних захисних середовищ. Тому, вибір залишаємо на рідкому препараті.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічним ефектом

Як рідку форму для пробіотиків попередньо було обрано оральні суспензії у флаконах/ампулах. Гарним прикладом може бути лікарський препарат Ентерожерміна, яка випускається у вигляді флаконів із 5 мл пробіотичної суспензії (на основі спор *Bacillus clausii*). За таким самим принципом створено оральну суспензію Флороспоріну та Євро-Біотику, які майже повністю повторюють склад Ентерожерміни. Також, як приклад можна навести PROBIELLE, який є комплексним пробіотичним препаратом у вигляді оральної суспензії у флаконах по 7 мл, що містить *L. acidophilus* NCFM®, *Lactacaseibacillus paracasei* Lpc-37®, *B. lactis* Bi-07®, *B. lactis* Bl-04®. Ще одним прикладом буде препарат Мутафлор, що містить *Escherichia coli* Nissle 1917, в одній коробці містить 5 ампул по 1 мл [73, 79-83].



Рис.3.2. Приклад оральної суспензії пробіотику у флаконах [79]

За попередніми розрахунками було визначено, що для розробленого препарату одна доза становить 1 мл. Тоді логічно обрати пластикові одноразові флакони/ампули об'ємом 1 мл. Наразі, на сучасних фармацевтичних підприємствах для таких препаратів використовують технологію BFS (Blow-fill-seal). BFS - це процес наповнення, при якому контейнери формуються з термопластичного грануляту, заповнюються продуктом, а потім герметизуються в безперервному, інтегрованому, автоматичному режимі. Також

великого поширення набуває технологія FFS (Form fill seal) – аналогічно BFS, вона включає формування великої трубки, сформованої з **гнучкого пакувального матеріалу**, потім у машині розливу трубка заповнюється формування пакетів великого обсягу, дана технологія використовується для більших об'ємів [84].

Технологія BFS дозволяє уникнути процес закупівлі готових пластикових ампул, а з врахуванням їх вартості, яка включає виробництво, упакування, зберігання та транспортування, самостійне виготовлення флаконів є дешевшим та передбачає закупівлю термопластичного грануляту. Проте, варто відповідально підходити до типу пластмаси, яка буде використовуватись у флаконах/ампулах [84,85].

При виробництві варто передбачити, що флакони мають бути доволі м'якими, щоб з них було легко та зручно выдавити суспензію. Зазвичай для таких цілей використовують поліетилен та полівінілхлорид (ПВХ). Полівінілхлорид досить добре переносить теплову стерилізацію, а флакони добре зберігаються при транспортуванні. Проте, даний вид пластику є дуже неекологічним і наразі є забороненим більшістю країн Європи (Німеччина, Швеція, Франція, Канада, Іспанія, Південна Корея, Чеська Республіка, та ін.). Це пов'язано з тим, щоб отримати гнучку упаковку до пластику додається пластифікатор - DEHP (ді (2-етилгексил) фталат), який може проникати в готовий препарат [86].

Наразі, є низка нових пластикових матеріалів, які використовуються для виробництва м'яких флаконів. Плівки з етиленвінілацетату (EVA) були розроблені для покращення таких характеристик, як сумісність з препаратом (тобто, відсутність впливу на якісні та кількісні характеристики лікарського засобу) і зменшення показнику проникнення вологи. Хоча EVA не містить пластифікаторів, він, як і ПВХ, має низьку стійкість до проникнення вологи. Проблема проникнення вологи була вирішена з розробкою багат шарових плівок. В одному випадку етиленовий (вініловий) спирт (EVOH), який має високий

газовий бар'єр, використовується як ядро та фізично з'єднаний між двома шарами плівки EVA [86].

Доступні додаткові плівки, які поєднують поліетиленову внутрішню плівку, що контактує з продуктом, з іншими бар'єрними плівками, такими як EVON. Контактний шар поліетилену (PE) продукту забезпечує відмінну хімічну сумісність і оцінюється як такий, що має чудову стійкість до кислот, спиртів, альдегідів, лугів, амінів, складних ефірів, гліколів, рослинних олій і солей. Отже, можна робити висновок про використання комбінованих поліматеріалів для створення якісних та безпечних флаконів [86]. Тому, пропонується порівняти 3 типи гранулят згаданих пластиків та обрати ті, які будемо використовувати в подальшому. Така характеристика наведена в табл.3.2.

Таблиця 3.2.

Характеристика пластмас, які використовуються для виготовлення м'яких флаконів

Назва	Вартість грануляту, грн/кг	Екологічність	Джерело
EVA	58,88	Виробництво EVA також може спричинити забруднення. Але існує декілька методів екологічно чистих способів його утилізації	[87]
EVON	158,25	Піддається переробці, а тому вважається екологічним	[88]
PE	40	Не екологічний	[89]

Поліетилен теоретично може впливати на молочнокислі бактерії [90], а тому не варто його використовувати для виробництва м'яких флаконів, незважаючи на його значні переваги, а особливо дешевизну. Тому пропонується виготовляти тришаровий флакон з системою EVA- EVON- EVA, як було вказано раніше [86].

Щодо кількості флаконів/ампул в одній коробці, оскільки одній людині потрібно в середньому 35 доз, логічно виготовляти флакони, об'єднані по типу флаконів, які використовуються для препарату Ентерожерміна у 5 штук, які потім

буде легко від'єднати один від одного. Таке рішення дозволяє уникнути використання додаткового пластикового вкладишу, куди треба було б вкладати ампули/флакони, як це часто використовується для їх скляних аналогів, а отже зменшується використання пластику та негативний вплив на екологію. Приклад вигляду первинної упаковки запропонованого препарату представлено на рис.3.3.

Апарати типу BFS набувають все більшого поширення, оскільки вони є універсальними, починаючи з формування форми, закінчуючи заповненням та закупорюванням лікарського засобу. Кількість флаконів на рік становить 10288845 штук. Знаючи кількість препарату, яка припадає на одну серію, можемо прорахувати необхідну потужність апарату BFS.



Рис.3.3. Приклад первинної упаковки пробіотичного препарату з гіпохолестеринемічним ефектом [91]

За одну серію одержується 113,68 л препарату, отже, кількість флаконів становить:

$$\frac{113\,680}{1} = 113\,680 \text{ флаконів}$$

Одним з непоганих варіантів є система BFS від компанії Tofflon. Вони можуть виготовляти флакони від 0,1 до 1000 мл, а продуктивність досягає до 12000 штук за годину. Система відповідає всім вимогам FDA та GMP, а тому ідеально підходить для наших потреб [92].



Рис.3.4. Система BFS від компанії Tofflon [92]

Етапи роботи апарату включають відлив форм, прийом, перевірку та складування вхідних контейнерів, миття та стерилізація тари, окремі етапи обробки та обладнання для наповнення та запечатування, та кінцевий етап маркування [92]. Принципова схема показано на рис.3.5.

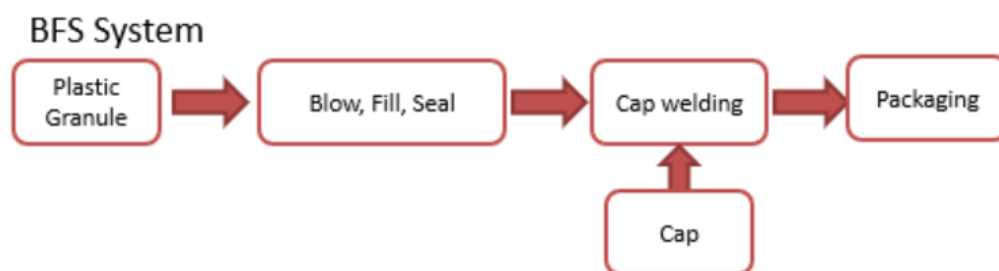


Рис.3.5. Принципова схема роботи BFS [92]

Вторинна упаковка лікарських засобів – це зовнішня тара. Вона поділяється на кілька категорій. Серед них [93]:

1. Коробки з картону. Вони використовуються для продажу таблеток, ампул, спреїв, флаконів. Така тара екологічна і економічна, її легко утилізувати.
2. Полімерна упаковка. Вона зручна у використанні. В основному застосовується для упаковки шприців. Випускається різної форми і щільності.
3. Вкладиші. Являють собою спеціальні картонні контейнери з осередками. Вони призначені для фіксації первинної упаковки (наприклад, ампул).

4. Роздільники. Використовуються для специфічних препаратів, які готують безпосередньо перед застосуванням.

Як було вказано раніше, пропонується використовувати пластикові флакони, поєднанні один між одним, що дозволяє не використовувати додаткового вкладишу. Як основну первинну упаковку пропонується використовувати картонну коробку, оскільки вона екологічна, зручна і її легко утилізувати, що додає ще більшої екологічності нашому препарату.

В Україні є велика кількість виробників, яка пропонує послуги виробництва та/або типографії коробок різних розмірів. До таких компаній відносяться “Видавничий дім “Укрпол”, ТОВ "Modern Pack", «Тріада-М», «Vesna», «UBI PACK STUDIO» та інші, тому вирішити питання виробництва коробок для фармацевтичних препаратів буде доволі легко [94-98].

Щодо обладнання, для цього використовується фасувально-пакувальний апарат. Варто визначити кількість коробок на 1 серію, для визначення необхідної продуктивності. В 1 коробці міститься 5 флаконів. Отже, кількість коробок:

$$\frac{113\,680}{5} = 22\,736 \text{ коробок}$$

Отже, як первинна упаковка виступають пластикові флакони/ампули на 1 мл, поєднані в 5 штук один між одним з використанням системи полімерів EVA-EVON- EVA, та картонна коробка, що забезпечать ефективне та якісне зберігання ліків.

3.3. Вибір пробіотичного штаму з гіпохолестеринемічним ефектом

Для вибору пробіотичного штаму особливу увагу варто приділяти ступеню акумуляції холестерину, яке здійснюють біологічні агенти. Оскільки більшість пробіотичних штамів представлено молочнокислими бактеріями – виконати порівняння за концентрацією біомаси буде неможливо, оскільки більшість статей розглядають лише показник концентрації життєздатних клітин. Тому, основне порівняння буде стосуватись саме ступеня зменшення холестерину в рідкому середовищі.

W. cibaria SCCB2306 це штам молочнокислої бактерії, який характеризується високим ступенем акумуляції холестерину. Даний штам показує хорошу коагрегацію разом з *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *B. cereus* ATCC 14576, *S. aureus* ATCC 19095 і *S. enterica* ATCC14028 [4,99].

L. plantarum TCI378 було виділено з корейських Кімчі. Даному штаму притаманна витримка низьких рівнів рН, а також толерантність до солей. Експресія специфічних для адипоцитів генів періліпіну 1 і транспортера глюкози типу 4 була пригнічена метаболітами TCI378, що вказує на те, що TCI378 може мати ефект проти ожиріння в адипоцитах [100].

L. mesenteroides FB111 також є потенційним агентом з гіпохолестеричним ефектом. Штам має високу антагоністичну активність проти *B. cereus*, *S. gallinarum*, *S. aureus*, *S. choleraesuis*, *S. typhi* та *S. boydii* [101].

Таблиця 3.3

Порівняння пробіотичних штамів за здатністю акумуляції холестерину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Кількість життєздатних клітин, КУО/мл	Ступінь акумуляції холестерину, %	Література
<i>W.cibaria</i> SCCB2306	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2, Ацетат натрію – 5, MgSO ₄ - 0,2, MnSO ₄ - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2	18 год, 37 °С	10 ⁸	78 ± 3	[4]
<i>L. plantarum</i> TCI378		24 год, 37 °С, рН 7,0	1,97×10 ⁹	48	[102]
<i>L. mesenteroides</i> FB111		12-16 год, 37 °С	10 ⁹	62,8	[103]
<i>E. faecium</i> 132		24 год, 37 °С	10 ⁹	23,62 ± 6,73	[106]
<i>L. plantarum</i> L8		12-16 год, 37 °С	10 ⁸	33	[104]
<i>S. cerevisiae</i> LC528139	Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 10, Глюкоза – 10	48 год, 37 °С, рН 6,5	10 ⁷	9,16	[107]

L. plantarum L8 також має непогані гіпохолестеричні властивості. Крім властивостей, які притаманні пробіотикам, даний штам характеризується протипухлинною активністю [102,103].

E. faecium 132 є пробіотиком, який регулює експресію генів *CYP8B1*, *CYP7A1*, *SREBP-1*, *SCD1* і *LDL-R* для сприяння метаболізму холестерину. Цей факт робить його гарним претендентом як пробіотика для зменшення холестерину [104].

S. cerevisiae LC528139 мають антимікробну дію до *E.coli*, *S. aureus*, *E.faecalis* та *C. albicans*. А також мають гіпохолестеричний ефект [105].

В таблиці 3.3. було порівняно всі вищезгадані продуценти. Найвищий гіпохолестеричний ефект відмічається в *W.cibaria* SCCB2306, а найнижчий – в *S. cerevisiae* LC528139. Проте, ці продуценти культивуються на різних середовищах. Тому, пропонується дізнатися приблизну вартість поживних бульйонів для ретельного порівняння пробіотичних штамів.

Таблиця 3.4

Розрахунок поживних середовищ для культивування пробіотиків з гіпохолестеричним ефектом

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело
Молочнокислі бактерії	Пептон – 10	240	2,4	1
	Дріжджовий екстракт – 5	147,69	0,74	2
	Яловичий екстракт – 10	443,07	4,43	3
	Глюкоза – 20	30	0,6	4
	КЗРО4- 2	77	0,15	5
	Ацетат натрію – 5	36	0,18	6
	MgSO ₄ - 0,2	23,1	0,005	7
	MnSO ₄ - 0,05	24,5	0,001	8
	Твін-80 – 1,08	82	0,09	9
	Цитрат амонію – 2	40	0,08	10
Вартість 1 л поживного середовища ≈ 8,68 грн				
<i>S. cerevisiae</i> LC528139	Дріжджовий екстракт – 3	147,69	0,44	2
	Пептон – 10	240	2,4	1
	Глюкоза – 10	30	0,3	4
	Вартість 1 л поживного середовища ≈ 3,14 грн			

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Peptone-60319839556.html?spm=a2700.7724857.0.0.45947cacqXfaY2>, 2 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Factory-60828177771.html?spm=a2700.8699010.29.6.2338a9abq0RVtR>, 3 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Factory-1600765081634.html?spm=a2700.7724857.0.0.13331c589F9FsC>, 4 - <https://prom.ua/p144210781-glyukoza-pishevayamagnij-okismetionin.html>, 5 - <https://prom.ua/p1267047719-ortofosfat-kaliya.html>, 6 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39526171-atsetat-natriya.html>, 7 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>, 8 - <https://kreond.com.ua/ua/p667853692-marganets-sernokislyj-sulfat.html>, 9- <https://megachem.com.ua/ua/tvin-80.html>, 10 - https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium_citrate/

З таблиці 3.4 видно, що пробіотичні дріжджі культивуються на більш дешевому середовищі. Різниця між МРС та цим середовищем очевидна і більша в 2,76 разів. Проте, асиміляція холестерину *S. cerevisiae* LC528139 нижча за *W.cibaria* SCCB2306 в 8,52 раз, через що, вибрати *S. cerevisiae* LC528139 буде неправильно.

Оскільки всі молочнокислі бактерії культивуються на тому самому середовищі та мають нижчий рівень асиміляції за *W.cibaria* SCCB2306, пропонується обрати саме цей біологічний агент для створення пробіотичного препарату з гіпохолестеринним ефектом.

3.4. Розрахунок потреби у пробіотику з гіпохолестеринним ефектом для випуску оральної суспензії у флаконах та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості пробіотику

Атеросклероз або ішемічна хвороба серця (ІХС) є найпоширенішою формою ССЗ, основним компонентом яких є накопичення ліпідів і запалення великих артерій, що в кінцевому підсумку може призвести до клінічних ускладнень, інфаркту міокарда та інсульту. Будучи повільно прогресуючим захворюванням, клінічно значущий атеросклероз виникає переважно у літніх людей і, незважаючи на зниження захворюваності в деяких країнах, залишається основною причиною смертності в усьому світі [106].

Зараз атеросклероз судин «помолодшав» і зустрічається вже після 30-35 років у 75% чоловіків та 38% жінок, 55-60 років ці цифри наближаються до 100%. Такою є статистика. Уражаються різні судини: серця, головного мозку, нирок,

кінцівок. Судини втрачають свою еластичність, просвіт їх звужується. Через це наші органи отримують менше крові, відповідно менше кисню. При фізичних навантаженнях, емоційних навантаженнях потреба кисню підвищується, а його організм не може. Це і є ішемія [107,108]. Загальна смертність від атеросклерозу судин в Україні становить 800,9 осіб (далі округлено до 801 осіб) на 100 000 населення [109].

Таблиця 3.5.

Показники ліпідограми при атеросклерозі [110]

Рівень	Концентрація			
	ЗХ, ммоль/л (мл/дл)	ЛПНЩ, ммоль/л (мл/дл)	ЛПВЩ, ммоль/л (%)	ТГ, ммоль/л (мл/дл)
Нормальний	5,2 (200)	3,4 (130)	0,9 (35)	2,3 (200)
Межовий	5,2-6,2 (200-240)	3,4-4,1 (130-160)	-	2,3-4,5 (200-400)
Підвищений	> 6,2 (> 240)	> 4,1 (> 160)	-	> 4,5 (> 500)

Для лікування цього захворювання використовують або статини або похідні фібрової кислоти. Проте, при тривалому лікуванні цими препаратами зростає небезпека токсичних проявів. Щодо пробіотиків, при визначеній дозі таких ефектів немає [110].

Одним із комерційно доступних пробіотиків, що знижують рівень холестерину, є CardioVivaTM, який був схвалений Міністерством охорони здоров'я Канади як безрецептурна дієтична добавка для серцево-судинної системи. Він також доступний у США та Європі. Продукт складається з капсул по 100 мг, кожна з яких містить 2 мільярди живих бактеріальних клітин штаму *L. reuteri* NCIMB 30242. Повідомлялося, що щоденний прийом продукту (2 капсули на день) знижує рівень холестерину ЛПНЩ на 11,6% при гіперхолестеринемії дорослих [111].

В табл.3.6. показано комерційні продукти, що містять пробіотики, які теоретично можна використовувати для профілактики ССЗ.

Пробіотики, які можна застосовувати проти ССЗ [112]

Назва	Виробник	Вміст	КУО	Характеристика
Yo-Plus yogurt	Yoplait Inc	<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12, <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	5 мільярдів	- Антиоксидантна активність - Холестеринознижувальна активність
DanActive cultured milk (Актімель)	Dannon Inc	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> DN-114 001.	10 мільярдів	- Знижувальна активність холестерину
Ultimate Probiotic Formula	Swanson Health Products	<i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Kyo-Dophilus blend</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. sporogenes</i>	60 мільярдів	- Знижувальна активність холестерину - Зменшення стеатозу печінки - Активність при артриті
VSL#3 saket	Sigma-Tau Pharmaceuticals	<i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. thermophilus</i>	450 мільярдів	- Знижувальна активність холестерину
OWP probiotics	One Wellness Place	<i>B. longum</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i>	15 мільярдів	- Зменшення стеатозу печінки
Adult Formula CP-1	Custom Probiotics Inc	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. lactis</i> and <i>B. bifidum</i>	50 мільярдів	- Знижувальна активність холестерину

Наразі на світовому ринку відсутні лікарські засоби пробіотиків з гіпохолестеринемічним ефектом. В Україні взагалі відсутні власні препарати/продукти такої дії. Закордонні аналоги пропонують лише функціональні продукти або дієтичні добавки. Цю тенденцію можна вважати негативною, оскільки деякі пробіотичні штами є умовно-патогенними і якщо не контролювати їх рівень споживання, вони можуть спричинити й до негативних наслідків. Отже, є потреба в українському виробництві лікарського препарату на основі пробіотичного штаму з гіпохолестеринемічним ефектом.

Загалом, орієнтовна доза пробіотиків на день для лікування атеросклерозу становить приблизно $10^6 - 10^8$ колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл [113]. Обраний біологічний агент, *W.cibaria* SCCB2306, акумулює сироватковий холестерин до $78 \pm 3\%$. Концентрація КУО/мл становить 10^8 . Тобто, дана

концентрація знаходиться на межі допустимої дози на день [4]. Це полегшує розробку препарату та його подальші розрахунки, оскільки при виділення та очистці до біомаси потрібно буде додати таку ж саму кількість води, що й відокремленого супернатанту для одержання цієї ж концентрації. Отже, одна доза становитиме 1 мл.

Кількість населення України станом на 2023 рік становить 36,7 мільйонів [114]. Знаючи, що на 100 000 населення припадає близько 801 випадків атеросклерозу [109], тоді кількість захворювання в Україні становить:

$$\frac{36\,700\,000 \times 801}{100\,000} \approx 293\,067 \text{ випадків}$$

Враховуючи те, що найменша тривалість лікування стеринами становить 4 тижні при ефективності 90%, пропонується лікування продовжити на 1 тиждень (в загальному 5 тижнів), оскільки *W. cibaria* SCCB2306 асимілюють $78 \pm 3\%$ сироваткового холестерину [4,110].

Тривалість курсу становить 5 тижнів, отже, кількість днів становить:

$$5 \times 7 = 35 \text{ днів}$$

Враховуючи те, що одна доза становитиме 1 мл, а на день потрібна лише 1 доза, на один курс одній людині потрібно:

$$35 \times 1 = 35 \text{ мл}$$

З врахуванням кількості випадків в Україні, на рік кількість пробіотику становить:

$$293\,967 \times 35 = 10\,288\,845 \text{ мл} \approx 10,3 \text{ м}^3$$

Кількість препарату еквівалентна кількості культуральної рідини. Проте, оскільки в Україні існують статини та інші препарати для лікування артросклерозу, пропонується забезпечувати всього 30% від загальної потреби. Отже, кількість культуральної рідини (без врахування втрат) становить:

$$10,3 \times 0,3 \approx 3,1 \text{ м}^3$$

З врахуванням того, що під час виділення та очистки будуть втрати, які становлять близько 4%, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{3,1}{1 - 0,04} \approx 3,3 \text{ м}^3$$

Таблиця 3.7.

Кількість пробіотику, яка потрібна для 30% населення України на рік

Біологічний агент	Кількість випадків	Курс лікування	Об'єм 1 дози	Кількість препарату на рік	Кількість культуральної рідини на рік
<i>W.cibaria</i> SCCB2306	293 067	5 тижнів	1 мл	3,1 м ³	3,3 м ³

Приймаємо, що для отримання 3,3 м³ культуральної рідини необхідно 30 робочих трудовнів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 3,1 / 30 \approx 103,3 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 103,3 \cdot 25 / 24 \approx 118 \text{ л},$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 18 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 25 години. K₁— коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K₁ = 1,1).

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ, А ТАКОЖ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

Оскільки пропонується виготовляти рідкий пробіотик, потрібно щонайменше змінити культуральне середовище на воду, оскільки воно може містити алергени, що будуть викликати небажану реакцію на препарат. Пробіотик представляє з себе живі клітини, які представлені біомасою. Отже, першою стадією буде відокремлення біомаси від супернатанту [115].

Далі варто передбачити промивання клітинного осаду для відмивання залишків поживного середовища. Це роблять з метою уникнення можливих алергічних реакцій людей до певних компонентів, що використовувались у поживному середовищі (наприклад, дріжджовий екстракт або твін-80, які присутні у виробничому середовищі для культивування *W. cibaria* SCCB2306). Також, навряд чи культуральне середовище є приємним на смак, а оскільки пропонується виробляти саме оральну суспензію, цей недолік варто передбачити на етапі розробки препарату. Тому, наступною стадією є промивання бактеріальної маси [115-117].

Після цього, препарат розчиняють у воді очищеній, яка є знесоленою та стерильною, для одержання суспензії, проте варто передбачити додаткові речовини, які будуть підтримувати життєздатність культури, а також частково подовжувати термін придатності препарату. Тому, наступною стадією є внесення допоміжних речовин та додавання води очищеної [73,115].

4.1. Обґрунтування відокремлення біомаси від супернатанту

Для відокремлення біомаси від супернатанту існує низка методів. Першим з них є відстоювання - поділ під дією гравітаційних сил. Проте, цей метод не підходить для промислового виробництва, оскільки він дуже

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Костенко К.В.				РОЗДІЛ 4 ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ, А ТАКОЖ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Старовойтова С.В.						64	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

довготривалий [118].

Фільтрація - пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, на якому затримуються частинки твердої фази. Такий спосіб застосовують у виробництві антибіотиків, особливо в тих випадках, коли мікроорганізм-продуцент має міцеліальний характер. Різновидом фільтрації є мікро та ультрафільтрація - пропускання суспензії через мембрани з дуже малим розміром пор, що забезпечує утримання клітин мікроорганізмів на мембрані та отримання розчину, вільного від зважених клітин. Ультрафільтрація затримує вже не тільки клітини, а й великі молекули розчинених речовин. Дану методику також недоцільно використовувати, оскільки біомаса буде затримуватись на фільтрах, потребує постійної їх відмивки, а після самої фільтрації буде важко забрати всю біомасу, оскільки вона буде знаходитись у порах фільтрів, що буде призводити до значних втрат [118].

Коагуляція - додавання в суспензію реагентів, що сприяють утворенню і осадження більш великих клітинних агрегатів і відділенню їх від рідини шляхом відстоювання. Дана методика підходить більше для екзометаболітів, що знаходяться в супернатанті, тому використовувати її недоречно [118].

Флотація - захоплення біомаси мікроорганізмів бульбашками піни і виділення її з пінної фракції. Даний процес зберігає біомасу, проте є дуже довготривалим, тому не підходить для запропонованого виробництва [118].

Сепарація, центрифугування - поділ під дією відцентрових сил. Найбільш часто використовується для відділення дріжджів або бактерій у виробництві кормової біомаси. Центрифугування варто розділити від сепарації, оскільки ці методи мають певні відмінності. Сепарацію використовують коли мова йде про суміші різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі. Центрифугування передбачає примусове осідання частинок під дією відцентрових сил. Головний недолік центрифуги, що вона може пошкодити клітини, що є небажаним ефектом для виробництва пробіотичного препарату, проте це вирішується пониженням швидкості обертів апарату, що призводить до меншого

виділення вологи, але зберігає при цьому цілісність клітин. Істотним недоліком сепараторів є швидка забиваємість мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями та мертвими клітинами. Проте, оскільки сепаратор дозволяє відокремити клітини без суттєвих пошкоджень, а це є важливим аспектом виробництва пробіотичного препарату залишаємо вибір саме на цьому методі [118].

З врахуванням того, що об'єм культуральної рідини за один цикл доволі великий, для таких цілей передбачається проточий сепаратор. Його принцип ґрунтується на тому, що до апарату постійно надходить культуральна рідина, проходить крізь ротор центрифуги, при цьому супернатант видаляється, а біомаса передається гідравлічним потоком до наступної стадії. Приблизний відсоток втрат на даній стадії становить 1%, але може становити і більше, в залежності від уважності працівника та обставин видалення біомаси з апарату [118].

За літературними даними, швидкість ротора при відокремленні біомаси *W. cibaria* становить 8000 об/хв. При цьому, в процесі, для збереження клітин, варто передбачити охолодження центрифуги, оскільки клітини потребують 4 °C для їх збереження [115,119,120].

4.2. Обґрунтування промивання біомаси

Зазвичай біомасу промивають стерильною знесоленою водою (інша назва – вода очищена), оскільки вона не має негативного впливу на клітини мікроорганізмів, не руйнує їх та не призводить до лізису, а також вона не містить додаткових контамінантів, які можуть впливати на якість та ефективність готового препарату. Але є випадки, коли біомасу промивають більш жорсткими розчинами. Прикладом може бути фосфатний сольовий буфер, який використовується у випадку, коли бажані клітини (наприклад, спори), є дуже стійкими до цього буферу, а також потребують ретельної відмивки. У випадку запропонованого виробництва, використовувати агресивні буфери немає потреби, але варто повторити процес промивання декілька разів [115,121].

В середньому, промивання здійснюють 2-3 рази. Тому, для забезпечення якісного продукту і для того, щоб бути повністю впевненими у якості кінцевої продукції, пропонується здійснити 3 промивки біомаси [115,122].

Для даного процесу варто передбачити воду очищену, оскільки звичайна вода питна містить різні солі, а також може містити контамінуючу мікрофлору, яка може пригнічувати клітини біологічного агента або спровокувати їх часткову загибель, що є небажаним процесом [115,122].

Промивання біомаси передбачає постійне відокремлення води, що передбачає знову ж таки сепарування. Якщо при поєднанні клітинного осаду з водою втрат не буде, то під час сепарації, як це було вище зазначено, вони становитимуть близько 1 %. З врахуванням того, що відмивка буде здійснюватися 3 рази, цей показник становитиме 3%.

4.3. Обґрунтування додавання допоміжних речовин

Аналізуючи дані щодо відомих оральних пробіотичних суспензій, частина з них немає допоміжних речовин, а складається лише з пробіотику та води очищеної. До таких препаратів відносяться Ентерожерміна та Флороспорін. Проте їх діюча речовина, це не молочнокисла бактерія, а бацила, яка є більш стійка до умов навколишнього середовища [74,75].

У пробіотику PROBIELLE використовуються молочнокислі бактерії, а допоміжний склад є наступним: фруктоза, арабін-галактоолігосахариди, загущувач Е-407 (карагенан), консервант Е-211 (натрію бензоат), ароматизатор, консервант Е-202 (калію сорбат), консервант Е-200 (сорбінову кислоту), алое вера, регулятор рН (натрію цитрат) і підкислювач (лимонну кислоту). Велика кількість консервантів може бути обумовлена тим, що це рідка форма, яка має короткий термін придатності. Наявність підсолоджуючих речовин є очевидною, оскільки пробіотики виділяють кислоту, а для приємного споживання препарату варто надати йому солодкий смак. Крім того, підсолоджувачі у даному випадку відіграють певну роль стабілізаторів, оскільки вони є додатковим джерелом підтримки активності пробіотиків [73,76].

Також, є ще один пробіотичний препарат на основі молочнокислих бактерій у вигляді оральної суспензії, це Лактімак. Його допоміжний склад є наступним: колоїдний гідратований діоксид кремнію, манітол, ароматизатор лимон, ароматизатор лайм, бікарбонат натрію, магнію стеарат. Ароматизатори використовуються для більш привабливого запаху препарату. Як підсолоджувач у цьому випадку використовують манітол. Діоксид кремнію використовується у якості сорбента, оскільки препарат направлено на покращення мікрофлори кишечника, а тому дана допоміжна речовина є логічною в даному складі. Бікарбонат натрію використовують як додатковий каталізатор розчинності пробіотичного препарату, оскільки сорбент його буде додатково захищати, він має вчасно спрацювати. Магнію стеарат також виступає у ролі стабілізатора [125-128].

Отже, проаналізувавши склади допоміжних речовин оральних пробіотичних препаратів, до препарату щонайменше потрібно внести один підсолоджувач та стабілізатор. Оскільки штам *W. cibaria* SCCB2306 синтезує кислоту лише на арабінозі та сахарозі, але може спокійно споживати глюкозу, як підсолоджувач, пропонується додати саме її [66]. При надлишковому синтезу кислоти, біологічний агент почне пригнічувати сам себе, тому обирати цукри, які можуть це спровокувати не є доцільним.

Зазвичай, кількість глюкози як підсолоджувача у такому препараті становить близько 5% від загального об'єму. Цієї кількості достатньо для стабілізації пробіотику, підтримки та подовження терміну придатності, а також цукру не забагато для того, щоб пригнічувати сам біологічний агент, тому саме таку кількість треба передбачити при додаванні глюкози до препарату [127].

Магній стеарат є гарним стабілізатором. Щодо *W. cibaria* SCCB2306 є дані, що магній стеарат гарно зберігає активність цього пробіотичного штаму. Тому, як стабілізатор пропонується обрати саме магній стеарат. Кількість стабілізатору також становить 5% від об'єму препарату, тому передбачається саме така кількість магнію стеарату [128,129].

Проте, є проблеми стосовно його розчинення. Він є нерозчинним в воді. Проте, розчинний в деяких спиртах, наприклад в манітолі (який з цією ж метою використовується в пробіотичній суспензії Лактімак [125]), та у висококонцентрованому розчині етанолу [126]. Етанол в концентрації 95% може спричиняти небажані реакції, оскільки це спирт, який буде пригнічувати не лише контамінанти, а й сам пробіотик, а також його застосування в лікарському засобі не дозволить його використовувати для дітей [130]. Манітол дозволяється використовувати для дітей, що є ідеальним рішенням зазначеної проблеми. В препаратах, де є нерозчинні речовини по типу магнію стеарату, манітол додають в кількості 2% [131]. Варто зазначити, що для *W. cibaria* дана кількість не буде мати негативних впливів, оскільки цей пробіотик може самостійно синтезувати манітол, та витримувати високі його концентрації [132].

Щодо терміну придатності такого препарату на основі біомаси *W. cibaria* SCCB2306 з магнієм стеаратом дослідження показують стабільність протягом 5 місяців при 4 °C, при цьому не використовується додаткових речовин. Варто зазначити, що дослідження показали стабільність препарату протягом 4 тижнів при 20 °C. З врахуванням того, що запропонований препарат містить не лише магнію стеарат, а ще й глюкозу, яка також частково виконує функцію стабілізатора, термін придатності буде ще довшим. Вищезгадані пробіотичні суспензії мають термін придатності близько 2 років. Враховуючи те, що дослідження з магнієм стеаратом велися лише 5 місяців, а препарат був абсолютно стабільним можна припустити, що стабільність тривається і більше, а з врахуванням наявності глюкози теоретично можна припустити, що термін придатності такого препарату при зберіганні при 4 °C становитиме 1 рік [128,129].

4.4. Обґрунтування розчинення препарату для виготовлення рідкої форми

Для рідких препаратів, які мають оральне використання зазвичай використовують воду знесолену та стерильну (воду очищену). Для всіх

вищенаведених препаратів [74-76, 123] використовується саме така вода, тому цей показник залишаємо без змін.

Підсумовуючи всю вищенаведену інформацію, приблизні втрати на стадіях виділення та очищення складатимуть 4%. Варто зазначити, що одержаний препарат матиме доволі великий об'єм, тому після його розведення пробіотик варто зберігати у збірнику при зниженій температури (4 °C) і за можливості, якнайшвидше його розфасувати.

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 118 л;
2. Концентрація біомаси *W. cibaria* SCCB2306 точно не відома. Зазвичай молочнокислі бактерії досягають біомаси в 6-8 г/л [130]. Оскільки поживне середовище є напівсинтетичним, прорахувати приблизну кількість біомаси також неможливо. Тому, пропонується рахувати, що приблизна кількість біомаси ($C_{біом}$) = 6 г/л;
3. Втрати під час очистки – 4%;

Враховуючи те, що кількість культуральної рідини становить 118 л, то кінцева кількість біомаси має становити $6 \times 118 = 708$ г. З врахуванням втрат ця кількість становитиме 679,68 г. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 4 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 3 Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	118 л	-	118 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 150 л
ТП 4 Сепарація культуральної рідини						
2	Сепарація культуральної рідини	Культуральна рідина	118 л	-	-	В проточній центрифугі
		Надосад	-	-	117,29 л	На утилізацію
		Осад	708 г	1%	700,92 г	В реактор на 5 л

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ	Лім.	Арк.
Перевір.		Старовойтова С.В.					71
Реценз.							127
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В.П.					

ТП 5 Промивання біомаси від залишків поживного середовища						
3	Промивання біомаси від залишків поживного середовища	Осад	700,92 г	-	-	В реакторі на 5 л
		Вода знесолена	4,2 л (по 1,4 л тричі)	-	-	
		Клітинна суспензія	-	-	2,1 л	До центрифуги
ТП 6 Сепарація клітинної суспензії						
4	Сепарація клітинної суспензії*	Клітинна суспензія	2,1 л	-	-	В центрифугі
		Надосад	-	-	1,4 л	На утилізацію
		Промита біомаса	700,92 г	3%	679,68 г	До ТП 3, а після усіх повторів в реактор на 5 л
ТП 7 Ресуспендування біомаси						
5	Ресуспендування біомаси	Промита біомаса	679,68 г	-	-	В реакторі на 150 л
		Розчин глюкози	30,06 л	-	-	
		Розчин магнію стеарату	83,06 кг	-	-	
		Ресуспендована біомаса	-	-	113,68 л	

Примітка* - оскільки сепарація безпосередньо зв'язано з промиванням біомаси (біомасу спочатку ресуспендують, в'язкий розчин подається на апарат, після чого відбувається відділення), сумарні втрати вказано одразу після етапу відокремлення біомаси від рідкої фази.

РОЗДІЛ 6

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ

Специфікація апаратурного обладнання для одержання пробіотику з гіпохолестеринемічним ефектом показано в табл.6.1

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання виробництва пробіотику

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
У-1 У-13	Ультрафільтраційна установка для приготування води знесоленої	1	Зворотний осмос OSFIL-250 продуктивністю 250 л/год. Ступінь видалення солей з очищеної води - до 99,7%. ¹
З-2	Збірник для зберігання води знесоленої	1	Збірник LansGT об'ємом 200 л. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість обертів мішалки від 20 до 600 об/хв. Робоча температура від -120 до 300 °С. Пересувний. ²
Д-3 Д-8 Д-11 Д-20	Дозатор об'ємно-ваговий	4	Дозатор рідинний. Продуктивність до 9999 л. Похибка дозування не більше 0,5%. ³
З-4	Збірник для стерилізації води знесоленої	1	Збірник об'ємом 10 л MDI. Оснащений подвійною сорочкою та перемішувачем пристроєм. Швидкість обертів мішалки від 20 до 600 об/хв. Робоча температура від -120 до 300 °С. ⁴
Д-5 Д-9	Вагові дозатори для відважування глюкози та магнію стеарату	2	Ваговий дозатор «Гігант». Продуктивність – 5 кг/хв. Бункер для завантаження – 300 л. Дискретність – 1 г. ⁵
З-6	Збірник для розчинення та стерилізації глюкози	1	Збірник об'ємом 40 л Т-40L. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Виконано з нержавіючої сталі. Швидкість обертів мішалки від 20 до 600 об/хв. Робоча температура від -120 до 300 °С. ⁶
З-10 З-14	Збірник для магнію стеарату	1	Збірник об'ємом 100 л. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Виконано з нержавіючої сталі. Швидкість обертів мішалки від 0 до 450 об/хв. Робоча температура від -120 до 300 °С. ⁷
З-16	Збірник для зберігання культуральної рідини об'ємом 150 л	1	Збірник WHGSM на 150 л. Матеріал – нержавіюча сталь. Оснащений подвійною сорочкою. Має мішалку. ⁸

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.
Перевір.		Старовойтова С.В.					72
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>	
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
						Аркушів	127

Н-7 Н-12 Н-15 Н-17 Н-21 Н-25	Насоси перистальтичні	6	Насос перистальтичний Seko Spring S1. Продуктивність – 500 л/год. Робочий тиск до 7 бар. ⁹
С-18	Сепаратор проточного типу для відокремлення біомаси	1	Проточний сепаратор з гідравлічним відвантаженням біомаси. Продуктивність – 300-500 л/год. Корпус з нержавіючої сталі. Швидкість ротора – до 10000 об/хв ¹⁰
3-19	Збірник для промивання біомаси об'ємом 5 л	1	Збірник LansGT об'ємом 5 л. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість обертів мішалки від 20 до 600 об/хв. Робоча температура від -120 до 300 °С. Пересувний. ²
Н-22	Насос перистальтичний для перекачування клітинної суспензії до центрифуги	1	Насос перистальтичний SEKO PSH 30. Продуктивність 30 л/год. Робочий тиск до 0,1 бар. ¹¹
С-23	Сепаратор для центрифугування промитої біомаси	1	Сепаратор з гідравлічним вивантаженням, модель Х. Габарити: 2000*1200*1800 мм. Об'єм завантаження – 8 л. Швидкість ротора – від 4000 до 10000 об/хв. ¹²
3-24	Збірник для промитої біомаси	1	Реактор об'ємом 150 л, оснащений подвійною сорочкою, та виконаний зі сталі нержавіючої. Має перемішувачий пристрій. ¹³

Примітка: 1 - <https://osmosfilter.com.ua/ua/p1479291434-obratnyj-osmos-osfil.html>, 2 - https://www.alibaba.com/product-detail/LansGT-5L-10L-Chemical-Stainless-Steel_1600861653606.html?s=p, 3 - https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw1YCKBhAOEiwA5aN4AdumWFEY2RL0-cNrZT3uZkgCr2bFthPIO8Hu_8dXLER8eHQj2BaSFxoCqgIQAvD_BwE, 4 - <https://ssllc.com/product/Northland-Stainless-MDI-Jacketed-Reactor-Vessel-With-Lightnin-Agitation-A21255>, 5 - <https://prom.ua/p9668963-vesovoj-dozator-50gr.html>, 6 - https://www.ollital.com/40l-60l-80l-lined-stainless-steel-chemical-reactor_p696.html, 7 - <https://www.cldlbooths.com/product/stainless-steel-reactor/>, 8 - https://www.alibaba.com/product-detail/WHGCM-New-150L-China-Supply-Stainless_1600789373990.html?s=p, 9 - <https://waterstore.ua/ua/seko-spring-s1-500-lch-nasos-dozator-dlya-bassejna/>, 10 - https://russian.alibaba.com/p-detail/Huading-1600076137365.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.4fbf49678metUv, 11 - <https://dosingtech.com.ua/product/peristalticheskij-nasos-seko-serii-psh-30-60-90-120-l-ch-0-1-bar-sekobril-2/>, 12 - https://russian.alibaba.com/p-detail/Customized-60697064049.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.58b57d3dalrV5S, 13 - https://www.alibaba.com/product-detail/150L-Jacket-Reactor-Stirred-Tank-Reactor_1600637587060.html,

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИКУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ

Як допоміжні роботи передбачається підготовка води очищеної, яка потрібна для промивки біомаси, а також для її ресуспендування. Після цього, починається технологічний процес.

ДР 1. Приготування води очищеної

ДР 1.1. Одержання води знесоленої

Для знесолення водопровідної води використовуються установка зворотного осмосу (У-1). Об'єм даної води, яка необхідна для однієї серії виробництва пробіотику, становить 106 л. Процес отримання води триває 30 хв. Для цього, вода водопровідна подається до установки зворотнього осмосу, яка проходить фільтри очищення. Отримана знесолена вода зберігається у збірнику (З-2).

ДР 1.2. Стерилізація води знесоленої

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-3) та перистальтичного насосу (Н-7) до збірника об'ємом 10 л (З-4) подається вода знесолена у кількості 4,2 л. Кришку збірника (З-4) закривають, а до його сорочки подають глуху пару. Встановлюється температура стерилізації 121 °С та тиск 0,075 МПа. Тривалість процесу – 20 хв. Після чого, одержану очищену воду охолоджують до температури 4 °С, подаючи до сорочки воду охолоджену.

ДР 2. Стерилізація допоміжних компонентів

ДР 2.1. Стерилізація глюкози

На ваговому дозаторі (Д-5) зважують 5,66 кг глюкози та переносять до збірника на 40 л (З-6). За допомогою перистальтичного насосу (Н-7) від збірника (З-2) до збірника (З-6) подають воду знесолену, при цьому відміряючи

ІІ					на			
					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Костенко К.В.				РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПРОБІОТИКУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Старовойтова С.В.						74	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

об'ємно-ваговому дозаторі (Д-8) в об'ємі 24,4 л. Кришку збірника закривають, а до сорочки подають глуху пару. Встановлюється температура стерилізації 112 °С при 0,05 МПа. Тривалість процесу – 20 хв. Після чого, одержаний розчин глюкози охолоджують до температури 4 °С, подаючи до сорочки воду охолоджену.

ДР 2.2. Стерилізація магнію стеарату

На ваговому дозаторі (Д-9) зважують 2,27 кг сухого порошку манітолу. Порошок подають до збірника (З-10). Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) доливають 75,1 л води знесоленої. Вмикається мішалка для повного перемішування. Після цього, на тому ж самому ваговому дозаторі (Д-9) зважують 5,66 кг магнію стеарату та переносять до збірника на 100 л (З-10), де вже міститься розчин манітолу. Знову вмикається мішалка до повного перемішування однородного розчину. Після цього, розчин подається на ультрафільтраційну установку (У-13) з керамічними фільтрами діаметром пор 0,22 мкм за допомогою перистальтичного насосу (Н-12). Тривалість всього процесу – 2 години. Розчин потрапляє до збірника (З-14) задля його зберігання та охолодження до 4 °С, подаючи до сорочки воду охолоджену. Далі, розчин передають перистальтичним насосом (Н-15) на наступну стадію.

ТП 3. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у З-16 при 4-8 °С для подальшого виділення та очищення пробіотичного препарату на основі біомаси *W. cibaria* SCCB2306.

ТП 4. Сепарація культуральної рідини

За допомогою перистальтичного насосу (Н-17) до проточному сепараторі (С-18) надходить культуральна рідина від ТП 3. Встановлюється швидкість центрифугування – 8000 об/хв. Тривалість центрифугування становить 15 хв. Під час центрифугування підтримується температура 4 °С за допомогою подачі до сорочки центрифуги води охолодженої. Після чого, супернатант передають на

знешкодження, а біомасу за гідравлічним потоком передається до збірнику на 5 л (З-19).

ТП 5. Промивання біомаси від залишків поживного середовища

До збірнику (З-19) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-20) та перистальтичного насосу (Н-21) доливають 1,4 л води очищеної (від ДР 1.2). Вміст реактора перемішують при 50 об/хв протягом 10 хв. При цьому, підтримується температура 4 °С за допомогою подачі до сорочки реактору води охолодженої. Після цього, суспензію подають на наступну стадію.

ТП 6. Сепарація клітинної суспензії

За допомогою перистальтичного насосу (Н-22) до сепаратора (С-23) подають клітинну суспензію. Встановлюється швидкість центрифугування – 8000 об/хв. Тривалість центрифугування становить 15 хв. Під час центрифугування підтримується температура 4 °С за допомогою холодильної камери, що передбачена в конструкції центрифуги. Надосад передають на знешкодження, а промиту біомасу повертають на минулу стадію і повторюють ТП 4 та ТП 5 ще 2 рази. Після останньої промивки, біомасу вручну переносять до збірнику (З-19).

ТП 7. Ресуспендування біомаси

До збірнику (З-24) за перистальтичного насосу (Н-25) в асептичних умовах подають 30 л стерильного розчину глюкози (від ДР 2.1) та за допомогою перистальтичного насосу (Н-15) подають 83 л стерильного розчину магнію стеарату (від ДР 2.2). Вміст реактора перемішують при 50 об/хв протягом 10 хв. Температура реактору підтримується на рівні 4 °С. Після повної гомогенізації усіх компонентів, розчин залишають у закритому реакторі з підтримкою вказаної температури.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

8.1. Визначення концентрації життєздатних клітин

Дане визначення треба проводити під час зберігання культуральної рідини, а також протягом усього виробничого процесу [133].

Для визначення КУО/мл необхідно розвести субстанцію за допомогою води дистильованої в 100 раз. Після чого, 0,1 мл висіяти на МРС-агар. Рівномірно розподілити рідину по агару, поставити в термостат при 37 °C на 48 год. Культура є факультативним анаеробом, тому може рости як в аеробних так і в анаеробних умовах. На агарах зазвичай штами *W. cibaria* вирощують аеробно, тому потреби у створення безкисневих умов немає [134,135]. Після культивування роблять підрахунок колоній та перераховують за наступною формулою [133]:

$$n=(C \cdot d)/V$$

де C – кількість підрахованих колоній, од,

d – коефіцієнт розведення,

V – об'єм проби, мл.

КУО/г визначається таким самим чином, проте, замість культуральної рідини, в 1 мл розчиняють 0,01 г біомаси і проводять всі ті самі махінації, що й в попередньому аналізі [133].

8.2. Мікробіологічний контроль субстанції

Субстанція складається з біомаси молочно-кислої бактерії *W. cibaria*, а тому потрібно контролювати мікробіологічну чистоту препарату. Швидким аналізом є саме мікроскопіювання. Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом з імерсійною системою. Методика мікроскопіювання [136]:

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИЧНОЇ СУБСТАНЦІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.В.					77	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини або проміжкового продукту, де міститься біомаса або вже готову субстанцію і розподіляють її рівномірно на площі 1-4 см², зробивши якомога тонший мазок. Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Фіксують препарат тричі проведши скло з препаратом через верхню частину пальника. Фіксований препарат заливають кількома краплями барвника – генціанвіолетом. Розподіляють барвник по всій поверхні мазка. Фарбують препарат протягом 5 хв. Потім фарбу зливають, препарат добре промивають дистильованою водою. Скло з країв протирають фільтрувальним папером, препарат висушують при кімнатній температурі або в термостаті при 37 °С для пришвидшення процесу. Потім на абсолютно сухий препарат наносять краплину імерсійного масла. Мікроскопіюють під великим збільшенням мікроскопа (×90). Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [136].

Якщо субстанція мікробіологічно чиста, під мікроскопом видно грампозитивні клітини, які є малорухливими, не утворюють спори, та мають форму коротких паличок, які з'являються або поодинці або парами [134].

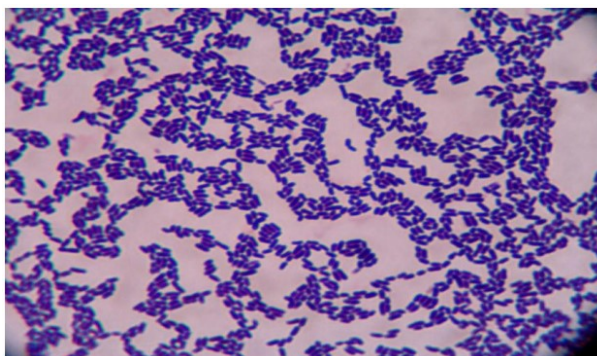


Рис.8.1. Клітини *W. cibaria* під світловим мікроскопом із збільшенням в 1000 раз [136]

Також, до мікробіологічного контролю також відноситься прямий висів на агаризоване поживне середовище. Для молочнокислих бактерій зазвичай притаманне середовище MRS. Також, штами *W. cibaria* можуть висівати на

кров'яний овечий агар, оскільки вони володіють гемолітичними властивостями [136-138]. Для цього, використовують методику, що наведено в п.8.1.

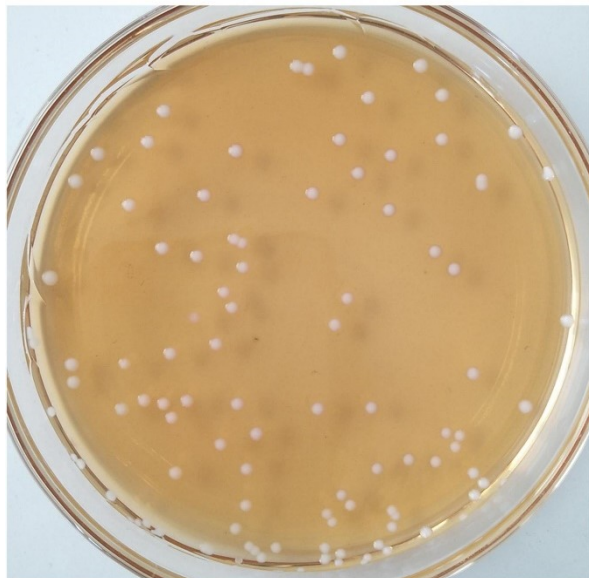


Рис.8.1. Колонії *W. cibaria* на MRS середовищі [138]

8.3. Визначення ступеня акумуляції холестерину

Попередньо, відбирають 1 мл субстанції та розчиняють його в 9 мл стерильної води. Розчин висівають на МРС агар та ставляють в термостат при 37 °С на 48 год. Після цього, одну колонію інокують у 10 мл бульйону MRS, доданого 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину та інкубують при 37 °С протягом 24 годин. *E. coli* OP50 (негативний контроль) вирощують в бульйоні LB, доданому оксалом і водорозчинним холестерином, і інкубують при 37 °С протягом 24 годин. Клітини збирають центрифугуванням при 10000×g протягом 5 хвилин при 4 °С. Для приготування клітин, убитих теплом, осад клітин суспендують в дистильованій воді (10 мл) і автоклавують при 121 °С протягом 15 хвилин. Мертві клітини суспендують в бульйоні МРС, доданому 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину, та інкубували при 37 °С протягом 24 годин. Для клітин у стані спокою осад клітин суспендували в 10 мл стерильного 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,8), що містить 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину. Клітини інкубують при 37 °С протягом 24 годин. Один мілілітр кожного супернатанту додають до 2 мл 33% гідроксиду

калію та 3 мл 95% етанолу. Суміш перемішують протягом 30 с і нагрівають протягом 10 хв на водяній бані при 60 °С. Суміші дають охолонути до кімнатної температури (26 °С) і змішують з 5 мл гексану, після чого додають 1 мл дистильованої води. Пробірки залишають на 10 хвилин при кімнатній температурі для відділення органічної фази від водної. Гексанову фазу (3 мл) переносять в чисту пробірку і випарюють в струмі азоту. Чотири мілілітри свіжоприготованого О-фталевого альдегіду (0,5 мг О-фталевого альдегіду/мл оцтової кислоти) змішують з концентрованою фазою і залишають на 10 хвилин при кімнатній температурі. До суміші додавали концентровану сірчану кислоту (2 мл) і перемішували протягом 1 хв. Поглинання зчитували при 550 нм за допомогою спектрофотометра [139].

Здатність знижувати холестерин розраховували у відсотках використовуючи наведене нижче рівняння [139]:

$$\text{Здатність до зниження рівня холестерину (\%)} = [(C1 - C2) \times 100] / C1,$$

де C1 — кількість холестерину в бульйонах MPC у час = 0, а C2 — кількість холестерину в бульйонах MRS у час = 24 год.

8.4. Визначення пробіотичних властивостей

Як було наведено в розділі 3 (див.вище), бактерії *W. cibaria* володіють кислотоутворювальною здатністю, галактозидазною, адгезивною та протеолітичною активностями, також вони стійкі до деяких антибіотиків та мають антагоністичну активність. Всі ці параметри варто перевірити.

8.4.1. Визначення кислотоутворювальної здатності

Важливим критерієм підбору пробіотичних мікроорганізмів до складу бактеріотерапевтичних препаратів та заквасочних культур є їх здатність продукувати L(+)-молочну кислоту [140].

Субстанцію центрифугують та за оптичним стандартом мутності готують суспензію 1 млрд клітин/мл у фізіологічному розчині. По 1 мл такої суспензії вносять у пробірки з 9 мл середовища Блаурока (для лактобактерій - середовище MPC) та культивують при 37 °С в анаеробних умовах упродовж 24-48 год. З

кожної пробірки відбирають по 5 мл суспензії та титрують розчином 0,1 н натрію гідроксиду за присутності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Кінцевий результат виражають у градусах Тернера за формулою:

$$T_o = A \times K \times 20$$

де А - об'єм 0,1 н лугу на титрування 5 мл суспензії; К - коефіцієнт, що визначається при титруванні 0,1 н розчину лугу 0,1 н бурштиною кислотою; T_o - об'єм 0,1 н лугу на титрування 100 мл досліджуваного зразка.

8.4.2. Визначення галактозидазної активності

Непрямою ознакою β -галактозидазної активності молочнокислих бактерій є їх кислотоутворювальна активність. Кількість молочної кислоти, що утворилася визначають за нарощуванням титрованої кислотності молока з розрахунку, що 1 T° відповідає 1 см 0,1 н розчину лугу. Таким чином, 1 T° відповідає [140]:

$$90 / (10 \times 1000) = 0,009 \text{ молочної кислоти}$$

При цьому кількість збродженої лактози визначається за формулою:

$$L = (342 \times 0,009 \times (K_2 - K_1)) / 360,$$

де: L - кількість збродженої лактози; K_1 - початкова кислотність заквашуваного молока, T° ; K_2 - кислотність згустку після сквашування, T° ; 0,009 - кількість молочної кислоти, що відповідає 1 T° ; 342 - молекулярна маса лактози; 360 - молекулярна маса чотирьох молекул молочної кислоти.

За отриманими результатами визначають показник I_L - індекс лактозозброджувальної активності за формулою:

$$I_L = L / L_T$$

де: L - кількість лактози зброджена конкретним штамом; L_T максимальна з виборки кількість збродженої лактози.

8.4.3. Визначення адгезивної активності

Адгезивна активність визначається за допомогою різних методів: мікробіологічних, світлової та електронної мікроскопії, біофізичних і математичних. Найпростішим є метод дослідження взаємодії мікроорганізмів з небіологічними (абіотичними) матеріалами - вуглеводнями та різними твердими поверхнями [140].

Одним з доступних і швидких методів кількісного визначення гідрофобності поверхні клітин є метод Розенберга, який базується на визначенні адгезії клітин на поверхні розподілу фаз рідких вуглеводнів та води в біфазній системі вуглеводень-вода після короткого періоду перемішування, а також його модифікації.

Суть методу визначення специфічної адгезії полягає в тому, що субстанція, що містить бактеріальні клітини, змішується та деякий час інкубується за певних умов з еукаріотичними клітинами-мішенями (епітеліальні клітини, еритроцити, шматочки органів, тканинні та органні культури, слизова кишечника тощо). Найчастіше у світовій практиці використовують людські Сасо-2 епітеліальні клітини.

8.4.4. Визначення протеолітичної активності

Визначають за методом ФОЛП, що базується на визначенні тирозину, утвореного в результаті гідролізу білка, з реактивом Фоліна. За одиницю протеолітичної активності приймають здатність ферменту каталізувати гідроліз 1 г білку (казеїну) у строго визначених умовах: температура 40 °С, рН 10,5, тривалість гідролізу 1 год [140].

У три пробірки, одна з яких є контрольною, наливають по 5 мл 1 %-ного розчину казеїну та витримують при температурі 40 °С 5 хв. У першу (контрольну) пробірку додають 2,5 мл дистильованої води, у решту - по 2,5 мл субстанції. Вміст пробірок ретельно перемішують та витримують упродовж 60 хв при температурі 40 °С. По завершенні гідролізу в кожную з пробірок додають по 5 мл 0,3 М розчину трихлороцтової кислоти (ТХО), щоб зупинити ферментативну реакцію та осадити білок і високомолекулярні продукти гідролізу.

Суміш швидко перемішують та для повноти осадження білку витримують 15 хв при температурі 40 °С. Далі розчини фільтрують через фільтрувальний папір та у фільтраті визначають кількість прогідролізованого білку за тирозином. Для цього беруть три пробірки і в кожную, починаючи з першої (контрольної), наливають по 2 мл фільтрату, далі повільно додають по 5 мл 0,5 М розчину вуглекислого натрію та по 1 мл робочого реактив Фоліна, (розводять основний

реагив Фоліна безпосередньо перед аналізом у співвідношенні 1:3) безперервно перемішують, витримують (для розвитку забарвлення) при температурі 40 °С упродовж 30 хв, охолоджують до кімнатної температури і фотометрують при 630-670 нм та довжині світлового шляху 5 мм. Оптичну густину досліджуваних зразків вимірюють відносно контрольної проби. Значення оптичної густини повинні перебувати в діапазоні 0,15-0,70. Протеолітичну активність (ПС) підраховують за формулою та виражають в од/мл:

$$\text{ПС} = 4,7 \times \text{P} + 0,1 \times 1000 \text{ т}$$

де Б - оптична густина досліджуваного розчину; т - об'єм культуральної рідини, мл; 4,7 та 0,1 - постійні коефіцієнти, встановлені експериментально, г/год; 1000 - коефіцієнт для переведення мл у л.

8.4.5. Визначення антагоністичної активності пробіотичних мікроорганізмів

Методи *in vitro* дозволяють досить просто і швидко перевірити великий масив штамів молочнокислих бактерій і / або тест-культур небажаних мікробів [140].

При використанні методу блоків 1 мл субстанції висівають глибинним способом в агаризованому поживному середовищі у чашці Петрі і інкубують в оптимальних умовах для утворення та накопичення в агарі інгібіторних речовин. Потім стерильним пробковий свердлом вирізують агаровий диск (блок) з досліджуваною пробіотичною культурою та встановлюють його в іншій чашці Петрі на поверхні агаризованого поживного середовища, щойно засіяного культурою тест-штаму. Чашку витримують протягом певного часу в холодильнику (щоб уникнути передчасного росту тест-штаму) для дифузії інгібіторних з'єднань з блоку в товщу агару з тест-штамом, а потім інкубують при умовах, оптимальних для тест-штаму. Про ступінь антагоністичної активності досліджуваної пробіотичної культури судять за величиною зони пригнічення росту тест-штаму навколо агарового блоку. Для тест-штаму в чашці Петрі доцільно формувати двошаровий агар: на дно чашки наливають 15 см³ незасіяного розплавленого щільного (2% агару) поживного середовища (нижній

шар), після застигання якого на поверхню нашаровується 5 см³ напіврідкого (0,35% агару) середовища, що містить тест-культуру (верхній шар); це забезпечує більш рівномірний розподіл тест-штаму по всій поверхні чашки. На відміну від методу перпендикулярних штрихів, метод блоків дає можливість порівняти на одній чашці кілька (4-8) штамів лактобактерій щодо даної тест-культури.

Перевагою методу блоків є те, що він дозволяє використовувати різні за складом поживні середовища: одне (блок) - для досліджуваної пробіотичної культури, інше - для конкретного тест-штаму. Крім того, він зручний для вивчення впливу складу поживного середовища на продукцію інгібіторних з'єднань досліджуваної пробіотичної культури.

8.4.6. Визначення стійкості пробіотичних мікроорганізмів до дії антибіотиків

Першим етапом є виконання посіву пробіотичної культури на щільне поживне середовище однорідним шаром. Визначення стійкості пробіотичних мікроорганізмів до дії антибіотиків різних груп проводять методом паперових дисків, який полягає у дифузії в агар антибіотиків зі стандартних паперових дисків, які просочені певним дезрозчином в чітко визначеній концентрації. Такі диски встановлюються на щільне поживне середовище з попередньо засіяною культурою рівномірно на відстані від краю чашки Петрі близько 20 мм та на такій же відстані один від одного. В одній чашці можна встановлювати диски з різними препаратами або з різними концентраціями однієї досліджуваної речовини [140].

Для оцінки ступеня чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів при виконанні дослідження будь-яким із наведених методів вимірюють зону затримки росту тестової культури. Відсутність зони затримки росту вказує на те, що досліджувана культура не чутлива до дії даного антимікробного засобу. При діаметрі зони до 15 мм вважають, що мікроорганізми мають малий ступінь чутливості до досліджуваного засобу, діаметр зони від 15 до 25 мм вказує на середній ступінь чутливості. Наявність зони діаметром більше 25 мм свідчить про високий ступінь чутливості мікроорганізмів до даного антимікробного засобу.

8.5. Карти постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Карта постадійного контролю стадій виділення та очищення рідкого пробіотичного лікарського засобу на основі біомаси *W. cibaria* SCCB2306

Номер контрольно-ї точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Одержання води знесоленої</i>	Вода питна, тривалість процесу, рН води та її жорсткість	Таймер, рН-метр, солемір	Протягом всього процесу	$\tau=30$ хв $pH= 6,6-8,5$ $dH= 0,35$ мг-екв/л
Кт, Км 1.2 <i>Стерилізація води знесоленої</i>	Вода знесолена, температура, тиск та тривалість стерилізації, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр та таймер, мікробіологічний контроль	Протягом всього процесу стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	$P = 0,075$ МПа, $\tau = 20$ хв, $T_1 = 121^{\circ}C$, відсутність мікробіоти, $T_2 = 4^{\circ}C$
Кт, Км 2.1. <i>Стерилізація глюкози</i>	Глюкоза, температура, тиск та тривалість стерилізації, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр та таймер, мікробіологічний контроль	Протягом всього процесу стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 20$ хв, $T_1 = 112^{\circ}C$, відсутність мікробіоти, $T_2 = 4^{\circ}C$
Кт, Км 2.2. <i>Стерилізація магнію стеарату</i>	Магнію стеарат, манітол, температура, тривалість процесу, діаметр пор фільтра відсутність мікробіоти	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Протягом всього процесу стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	$d=0,22$ мкм $\tau = 2$ год, відсутність мікробіоти, $T = 4^{\circ}C$
Кт, Км 3.1. <i>Зберігання культуральної рідини</i>	Культуральна рідина, температура зберігання, відсутність сторонньої мікрофлори	Термометр	Протягом всього процесу зберігання	$T = 4-8^{\circ}C$, відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 4.1. <i>Сепарування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина, швидкість та тривалість центрифугування, температура процесу, відсутність сторонньої мікрофлори	Датчик вимірювання швидкості ротора, таймер та термометр	Протягом всього процесу центрифугування	$\omega=8000$ об/хв, $\tau = 15$ хв, $T = 4^{\circ}C$, відсутність сторонньої мікрофлори

Кт, Км 5.1. <i>Промивання біомаси від залишків поживного середовища</i>	Біомаса, тривалість та температура процесу, загальна кількість разів промивання, відсутність сторонньої мікрофлори	Таймер та термометр	Протягом всього процесу промивання	$\tau = 10$ хв, $T = 4^{\circ}\text{C}$, $n = 3$ рази, відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 6.1 <i>Центрифугування клітинної суспензії</i>	Клітинна суспензія, швидкість та тривалість центрифугування, температура процесу, кількість разів центрифугування, відсутність сторонньої мікрофлори	Датчик вимірювання швидкості ротора, таймер та термометр	Протягом всього процесу центрифугування	$\omega = 8000$ об/хв, $\tau = 15$ хв, $T = 4^{\circ}\text{C}$, $n = 3$ рази, відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 7.1 <i>Ресуспендування біомаси</i>	Біомаса, Швидкість перемішування мішалки, тривалість та температура ресуспендування, температура зберігання, відсутність сторонньої мікрофлори	Датчик вимірювання швидкості перемішування, таймер та термометр	Протягом всього процесу ресуспендування, а температуру зберігання – під час зберігання.	$\omega = 50$ об/хв, $\tau = 10$ хв, $T_{1,2} = 4^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікрофлори

Таблиця 8.2.

**Карта постадійного контролю стадій приготування готового
пробіотичного лікарського засобу з гіпохолестеринемічним ефектом**

Номер контрольно-ї точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітря, тиск	Манометр	Протягом усього забору повітря	$h = 20$ м, $P = 0,01-0,03$ атм

Продовження табл.8.1.

Кт 1.2 <i>Перший ступінь очищення повітря</i>	Повітря, вологість, температура, ступінь очистки	Манометр, термометр, аналізатор вологості, датчик очистки повітря	Протягом всього процесу очистки вентиляційного повітря	$t=24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $W=60\%$, $E=80\%$
Кт 1.3 <i>Другий ступінь очищення повітря</i>	Повітря, ступінь очистки	Датчик очистки повітря	Протягом всього процесу очистки вентиляційного повітря	$E=99,97\%$
Кт 1.4 <i>Третій ступінь очищення повітря</i>	Повітря, ступінь очистки	Датчик очистки повітря	Протягом всього процесу очистки вентиляційного повітря	$E=99,9997\%$
Кт 2.1 <i>Механічна фільтрація</i>	Вода водопровідна, затримка механічних частинок	Аналізатор механічних включень	До та після проходження піщаного фільтру	$\varnothing=5\text{ мкм}$
Кт 2.2 <i>Глибинна фільтрація</i>	Вода очищена від механічних частинок, затримка мікроскопічних частинок	Аналізатор механічних включень	До та після проходження вугільного фільтру	$\varnothing=1-3\text{ мкм}$
Кт 2.3 <i>Пом'якшення води</i>	Вода попередньо очищена, тривалість процесу, температура, жорсткість	Таймер, термометр, солемір	Протягом всього процесу	$\tau=1\text{ год}$ $t=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ $dH=0,35\text{ мг-}$ екв/л
Кт 2.4 <i>Зворотній осмос для видалення зайвих солей</i>	Пом'якшена вода, тривалість процесу, жорсткість	Таймер, солемір	Протягом всього процесу	$\tau=1\text{ год}$ $dH=0,15\text{ мг-}$ екв/л
Кт 3.1 <i>Видування, наповнення та запаювання флаконів</i>	Полімер EVA, пробіотична субстанція, температура, об'єм наповнення, тривалість процесу	Термометр, шприц, таймер	Протягом всього процесу, об'єм – після одержання готового флакону	$\tau=7\text{ год}$ $t=170\text{ }^{\circ}\text{C}$ $V=1\text{ мл}$
Кт 4.1 <i>Інспекція флаконів на герметичність та механічні включення</i>	Флакони, механічні включення, Герметичність, тривалість процесу	Світловий модуль, скомпресоване повітря, таймер	Протягом всього процесу інспекції	$\tau=10\text{ год}$, $P=0,6\text{ МПа}$
Кт 5.1 <i>Поклейка етикеток на флакони</i>	Флакони, етикетки, інформація на етикетках, тривалість процесу	Візуальний контроль, таймер	Протягом всього процесу етикування	$\tau=7\text{ год}$

Закінчення табл.8.2.

Кт 5.2 <i>Фасування флаконів у коробки</i>	Етиковані флакони, картонні коробки, тривалість процесу	Таймер	Протягом всього процесу	$\tau=3$ год
Кт 5.3 <i>Групове пакування лікарського препарату</i>	Коробки з лікарським засобом, групові картонні коробки, тривалість процесу, температура зберігання	Таймер, термометр	Протягом всього процесу	$\tau=20$ хв, $t=4$ °C

РОЗДІЛ 9

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНИХ ПРОБІОТИЧНИХ СУСПЕНЗІЙ З ХІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва пробіотичного препарату з хіпохолестеринемічним ефектом та кількості серій на рік

За один цикл одержується 113,68 л готової лікарської субстанції, яку потім розливають по флаконам. З врахуванням того, що препарат розливають по 1 мл в флакони, за одну серію одержуємо наступну кількість флаконів:

$$\frac{113\,680}{1} = 113\,680 \text{ штук}$$

Річна потреба в препараті складає 3,1 м³. Тоді, річна потужність виробництва складає:

$$\frac{3\,100\,000}{1} = 3\,100\,000 \text{ флаконів}$$

Знаючи загальну кількість флаконів та кількіть, яка припадає на серію, можемо дізнатись кількість серій на рік:

$$\frac{3\,100\,000}{113\,680} \approx 27 \text{ серій}$$

9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Оральні суспензії – це нестерильні лікарські засоби. Такі препарати зазвичай виготовляють в класі чистоти С та D, але оскільки мова йде про препарат, що містить мікроорганізми як основну субстанцію, пропонується виготовляти препарат в класі чистоти В (оскільки клас чистоти А використовується для виробництва ін'єкційних засобів) [141].

Клас чистоти В - це другий за рівнем чистоти клас у системі класифікації

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 9 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ОРАЛЬНИХ ПРОБІОТИЧНИХ СУСПЕНЗІЙ З ХІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.В.					90	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

чистоти ISO 14644-1. Цей клас передбачає, що кількість життєздатних мікроорганізмів у повітрі не повинна перевищувати 5 колонієутворюючих одиниць (КУО) на кубічний метр [141].

Клас чистоти В використовується для виробництва та обробки стерильних медичних виробів та інших продуктів, які не повинні містити патогенних мікроорганізмів. Приміщення класу чистоти В повинні бути оснащені системами очищення повітря, які забезпечують необхідний рівень мікробіологічної чистоти. Ці системи можуть включати в себе [141]:

- Фільтри для грубого очищення, які видаляють великі частинки, такі як пил і волосся [141].
- Фільтри для тонкого очищення, які видаляють дрібні частинки, такі як бактерії та віруси [141].
- Озонатори, які використовують озон для окислення мікроорганізмів [141].

Персонал, який працює в приміщеннях класу чистоти В, повинен проходити спеціальне навчання і дотримуватися правил санітарії. Ці правила включають в себе [141]:

- Носіння чистого спецодягу та взуття.
- Регулярне миття рук.
- Уникання контакту з продуктами, які виробляються або обробляються в цих приміщеннях.

Очищення повітря у виробничих приміщеннях В класів чистоти має бути тріступінчатим. На кожному рівні очищення слід використовувати фільтри, що по ефективності фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів [141]:

- 1 рівень - не нижче класу G 4
- 2 рівень - не нижче класу F 8
- 3 рівень - не нижче класу H 13

У фармацевтичному секторі виробництва була запропонована узагальнена схема підготовки повітря для приміщень класів А,В,С,Д (рис.9.1) [139].

Повітря виробничих приміщень-потенційне джерело забруднення лікарських засобів, тому його очищення (стерилізація) є одним з ключових питань технологічної гігієни. Якість очистки повітря суттєво залежить від роботи блоку підготовчих операцій [141]:

- попередня очистка від механічних забруднень
- кондиціювання з метою стабілізації термодинамічних параметрів повітря;
- використання системи рециркуляції відпрацьованого повітря.

Кондиціювання повітря складається з ряду операцій: перший підігрів, охолодження, другий підігрів, зволоження парою [141].

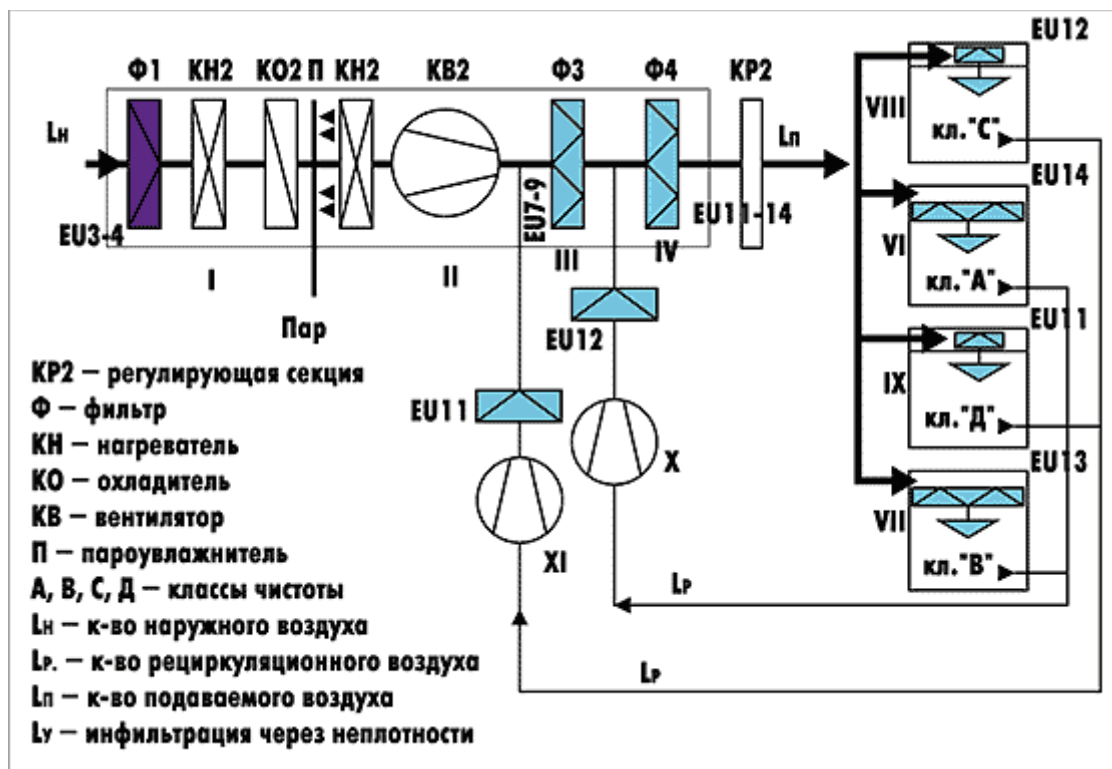


Рис.9.1. Узагальнююча схема підготовки повітря для приміщень класів А, В, С, Д з використанням центрального кондиціонеру та рециркуляцією повітря. КР 2 – секція для регулювання термодинамічних параметрів повітря; Ф – фільтри; КН – нагрівач; КО – охолоджувач; КВ – вентилятор; П – парозволожувач [141].

Тож, будемо опиратися на схему з рис.9.1. для підготовки вентиляційного повітря для класу чистоти В.

Проте, не всі технологічні операції мають відбуватись в класі чистоти В. Операції, які підлягають під даний клас передбачають виділення та очистку субстанції, приготування самого лікарського засобу, а також безпосередньо наповнення флаконів готовим препаратом з подальшим запаюванням. Після цього, йдуть технологічні операції, які не потребують таких жорстоких умов. Наприклад, інспектування та перевірку на герметичність готові флакони можуть проходити в класі чистоти С, а вже етикування, пакування та фасування – в класі чистоти D [141].

9.2.2. Підготовка персоналу

Персонал, який працює в приміщеннях класу чистоти В, повинен проходити спеціальне навчання і дотримуватися правил санітарії. Це необхідно для того, щоб запобігти забрудненню продукції патогенними мікроорганізмами [141].

Навчання персоналу для роботи в класі чистоти В включає в себе наступні етапи [141]:

1. Теоретичне навчання

На теоретичному етапі навчання персонал отримує інформацію про:

- Класифікацію чистоти ISO 14644-1
- Вплив мікроорганізмів на якість продукції
- Правила санітарії в приміщеннях класу чистоти В

2. Практичне навчання

На практичному етапі навчання персонал відпрацьовує навички:

- Носіння чистого спецодягу та взуття
- Регулярного миття рук
- Уникнення контакту з продуктами, які виробляються або обробляються в цих приміщеннях

Персонал, який працює в приміщеннях класу чистоти В, повинен дотримуватися наступних правил санітарії [141]:

- Носіння чистого спецодягу та взуття

Спецодяг та взуття персоналу, який працює в приміщеннях класу чистоти В, повинні бути чистими і без видимих пошкоджень. Спецодяг повинен бути змінений після кожного виходу з приміщення.

- Регулярне миття рук

Персонал повинен регулярно мити руки з милом і водою. Руки повинні бути миті перед початком роботи, після кожного виходу з приміщення і після будь-яких дій, які можуть призвести до забруднення рук.

- Уникнення контакту з продуктами, які виробляються або обробляються в цих приміщеннях

Персонал повинен уникати контакту з продуктами, які виробляються або обробляються в приміщеннях класу чистоти В. Це може призвести до забруднення продукції патогенними мікроорганізмами. Контроль за дотриманням правил санітарії персоналом, який працює в приміщеннях класу чистоти В, повинен здійснюватися керівником виробництва або іншою відповідальною особою [141].

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Деззасоби класифікуються за природою діючої речовини на хімічні та фізичні [140].

- Хімічні деззасоби містять у своєму складі активні речовини, які руйнують мікроорганізми. Хімічні деззасоби поділяються на наступні групи [142,143]:
 - Альдегіди (формалін, глутаровий альдегід, пропіленгліколь формальдегід, параформальдегід) – руйнують клітинні білки мікроорганізмів.
 - Аміни (хлорамін, дихлорамін, хлоргексидин, гексахлорофенол) – руйнують клітинні мембрани мікроорганізмів.

- Феноли (фенол, крезол, саліциловий фенолят, гексахлорофен) – руйнують клітинні білки і ферменти мікроорганізмів.
- Гліцеринові спирти (етанол, ізопропіловий спирт, бензиловий спирт) – руйнують клітинні мембрани мікроорганізмів.
- Оксигенвмісні речовини (перекис водню, озон) – руйнують клітинні мембрани і ферменти мікроорганізмів.
- Хлорвмісні речовини (хлорна вода, хлорамін, дихлорамін) – руйнують клітинні білки і ферменти мікроорганізмів.
- Фізичні деззасоби не містять активних речовин, а діють за допомогою фізичних факторів, таких як [142]:
 - Тепло (кип'ятіння, стерилізація паром) – руйнує клітинні білки і ферменти мікроорганізмів.
 - Холод (глибоке заморожування) – викликає руйнування клітинних мембран мікроорганізмів.
 - Світло (ультрафіолетове випромінювання, іонізуюче випромінювання) – викликає руйнування ДНК мікроорганізмів.
 - Високий тиск (гіпербарична оксигенація) – порушує клітинні мембрани мікроорганізмів.
 - Вакуум – викликає руйнування клітинних мембран мікроорганізмів.

Особливості вибору деззасобів для фармацевтичного виробництва класу чистоти В [142]:

- Дезінфекція повинна бути ефективною проти широкого спектру мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси, гриби та спори.
- Дезінфекція повинна бути швидкою та ефективною.
- Дезінфекція не повинна залишати після себе шкідливих залишків.

Хоча й виробництво працює всього 30 діб, варто передбачити 2 різних дезінфекційних засоби з різними діючими речовинами. Для запропонованого виробництва варто звернути на дезінфікуючі засоби, які містять наступні діючі речовини [143]:

- Глутаровий альдегід (алдегідний тип) – це високоактивний деззасіб, який використовується для дезінфекції поверхонь, обладнання та інструментів у фармацевтичному виробництві. Глутаровий альдегід має широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси, гриби та спори. Він швидко діє і не залишає після себе шкідливих залишків.
- Перекис водню (окиснені препарати) – це недорогий і ефективний деззасіб, який використовується для дезінфекції поверхонь, обладнання та інструментів у фармацевтичному виробництві. Перекис водню має широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси та гриби. Він діє швидко і не залишає після себе шкідливих залишків.

Тож, пропонується порівняти низку препаратів, що містять ці активні компоненти, та обрати 2 найкращих (економічно вигідних) препарати, по одному з кожної групи. Порівняння та відповідні розрахунки показано в табл.9.1.

З табл.9.1. найдешевшими препаратами з двох груп виявилися Деканаль та Періцид-НАТА. Щодо альдегідної групи варто звернути увагу на об'єми випуску препаратів, а також на їх властивості, адже в інструкції Деканаль не вказано про його антипротозойну дію, коли в інших препаратах вона є. Через це, пропонується звернути увагу на дорожчий за робочим розчином, але більш ефективний за описом препарат цього ж ряду - Ласепт Макс. Хоча він і найдорожчий, але має широкий ряд випуску за об'ємом продукції, що є привабливим спираючись на масштабність виробництва, а також ефективну дезінфікуючу дію.

Щодо кисневовмісних препаратів, їх вартість за робочий розчин майже не відрізняється одна між одним, так само як і їх властивості. Тому, пропонується залишити свій вибір саме на Періцид-НАТА.

Тож, за кінцевим порівнянням обираємо альдегідний препарат - Ласепт Макс та перекисоводневий - Періцид-НАТА.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Оскільки для виробництва запропонована технологія BFS, переваги якої наведено в п.3.2.2., особливої підготовки для первинної упаковки немає, оскільки

вона формується безпосередньо в системі BFS. Проте, особливістю цих систем є наявність або відсутність екструдера. Тобто, є системи, які потребують для

Таблиця 9.1.

Порівняння деззасобів для фармацевтичного виробництва пробіотичного препарату

Діюча речовина	Назва	Ефективність препарату	Вартість за 1 л, грн	Концентрація робочого розчину, %	Вартість за 1 л робочого розчину, грн	Об'єми випуску препарату, л	Джерело
Глутаровий альдегід	Ласепт Макс	Має активну протимікробну дію по відношенню до грамнегативної та грампозитивної мікрофлори, віруцидну дію, антипротозойну дію проти кокцидій, фунгіцидну дію.	800	0,25	0,2	1; 5; 10; 20; 200;	[144,145]
	Деканаль	Має бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні і спороцидні властивості	600	0,1	0,06	1	[146]
	Dezaldum 20	Має бактерицидні, віруліцидні властивості і антипротозойну дію проти кокцидій	165,4	1	0,165	5	[147]
Перекис водню	Вернедор-Оксі	Засіб має активність до збудників інфекцій бактерицидної, віруліцидної і грибової етіології, спороцидні властивості	490	0,025	0,012	1; 5;	[148,149]
	Періцид-НАТА	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію	107,8	0,1	0,010	1; 5;	[150,151]
	Бланідас-А Оксі 35	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію	114,3	0,1	0,011	1; 20; 5; 30;	[152]

виробництва флаконів готові трубочки, а є такі системи, які потребують гранул і самі виготовляють трубочки, з яких потім формується готовий флакон. Тому, при розгляді технологічного обладнання в п.2.5. (див.нижче), треба звернути увагу саме на системи BFS, які використовують саме гранули для виробництва флаконів.

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Оскільки виробництво передбачає виготовлення нестерильного лікарського засобу, для нього потрібна вода очищена. Для одержання води такої якості, її спочатку піддають механічній фільтрації крізь піщані фільтри, де видаляються частинки розміром до 5 мкм. Після цього, воду піддають грубій фільтрації, пропускаючи її крізь вугільний фільтр, тим самим затримуючи частинки розміром до 1-3 мкм. Наступною стадією є стадія пом'якшення, яка має декілька варіантів, які ділять на термічний, реагентний та термохімічний [141].

Найчастіше для фармацевтичних виробництв використовується метод діалізу (термохімічний метод). Воду нагрівають до температури вище 100 °С, при цьому виділяється карбонатна і некарбонатна жорсткості у вигляді осаду. У воду додають вапно, яка усуває карбонатну і магнієву жорсткість, а також соду, яка усуває некарбонатні речовини, які також могли випасти в осад. Помякшена вода пропускається через катіонітові фільтри. Через це, що це є найпоширенішим методом, який використовується у світі, пропонується залишити саме цю методику пом'якшення води [141].

Після того, як воду пом'якшують, її пропускають через напівпроникну мембрану для видалення солей. Зазвичай для цього використовується установка зворотнього осмосу. Зворотний осмос — перехід розчинника (води) з розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску. Надлишковий робочий тиск сольового розчину набагато більше осмотичного. Рушійною силою зворотного осмосу називають різницю тиску по обидві сторони мембрани. Зворотний осмос — дуже тонкий рівень фільтрації. Тож, кінцевим етапом

одержання води очищеної будемо вважати пропуск води по установці зворотнього осмосу [141].

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Отже, для виробництва оральних суспензій була запропонована технологія BFS. Виробництво субстанції закінчується тим, що до пробіотичного розчину додають допоміжні речовини, тим самим одержуючи напівфабрикт, який залишається та зберігається у збірнику. Отже, першою технологічною стадією буде формування, наповнення та запаювання флаконів з оральною суспензією. Для виробництва потрібно передбачити систему BFS, яка може забезпечити наші потреби, а саме виробництво флаконів об'ємом 1 мл у кількості 113 680 штук/серію.

Пропонується порівняти 3 системи BFS, та обрати ту, яка підходить для наших потреб найбільше. Порівняння показано в табл.9.2.

Таблиця 9.2.

Порівняння систем BFS

Назва	PBM Series	ASEP-TECH® MODEL 640	AFP4
Країна виробник	Китай	США	Китай
Бренд	SHINVA	Weiler Engineering, Inc.	VSUN
Форма основи для виробництва флаконів	гранули	гранули	гранули
Об'єм флаконів	0,4-2 мл	0,4-2 мл	0,4-1 мл
Продуктивність	10400 шт./год	18000 шт./год	12000 шт./год
Джерело	[153]	[154]	[155]

Отже, з таблиця 9.2. можна зробити висновок, що обрані машини обладнані екструдером, який розплавляє гранули, тим самим формуючи трубочки, які використовуються як основа для створення флаконів. Машини BFS дуже подібні один між одним, тому обирати будемо за продуктивністю апарату. За цим

показником найкращим претендентом на вибір є американська машина BFS - ASEP-TECH® MODEL 640. Через це, залишаємо свій вибір саме на цій системі.



Рис.9.2. Система BFS - ASEP-TECH® MODEL 640 та її габаритні розміри [154]

Після одержаних флаконів, їх інспектують на різні механічні включення а також на їх герметизацію. Для цього використовуються різні інспекційні машини. Тому, порівняння таких машин показано в табл.9.3.

Таблиця 9.3.

Порівняння інспекційних машин

Назва	IVEN -11	4000BPH	LT-S
Країна виробник	Китай	Китай	Італія
Бренд	Shanghai Iven Pharmatech Engineering Co., Ltd.	PERWIN	Marchesini Group S.p.A.
Габарити	2980*2000*2100 мм	2000*1600*2000 мм	Не вказано
Продуктивність	12000 шт./год	9000 шт./год	6000 шт./год
Джерело	[156]	[157]	[158]

Тож, з таблиця 9.3. очевидний вибір інспекційної машини IVEN -11, яка має найвищу продуктивність по перевірці флаконів. Апарат відповідає всім вимогам GMP та ISO 9001.



Рис.9.3. Інспекційна машина IVEN -11 [156]

Після інспекції, флакони потрібно промаркувати, але є особливість, а саме те, що флакони з'єднані один між одним, що ускладнює процес поклейки. Тому, з цією метою необхідно розглядати спеціалізоване обладнання. Порівняння таких машин показано в табл.9.4.

Таблиця 9.4.

Порівняння етикувальних машин

Назва	SML-690	RXL-A	ZS-TB823
Країна виробник	Китай	Китай	Китай
Бренд	NANJING	Z-Zone	ZONESUN
Габарити	2500×800×2100 мм	1950×1100×1300 мм	1430×1580×1590 мм
Продуктивність	120 флаконів/хв	120 флаконів/хв	300 флаконів/хв
Джерело	[159]	[160]	[161]

З таблиці 9.4. очевидне використання етикувальної машини ZS-TB823, у якої продуктивність 300 флаконів за хв. При цьому машина менше за габаритами, що зменшує виробничу площу.



Рис.9.4. Етикувальна машина ZS-TB823 [161]

Після того, як флакони проетикують, їх починають фасувати в картонні коробки. Оскільки флакони пластикові та з'єднані один між одним, додаткове використання вкладишу непотрібне. На цій стадії машина складає картонну заготовку, вкладає в готову коробку з'єднані флакони, а також інструкцію. Після чого, машина закриває коробку та додатково наносить на неї інформацію про номер реєстрації препарату, номер серії, дату виготовлення та термін придатності.

Порівняння фасувальних машин (кратонерів) показано в табл.9.5.

Таблиця 9.5.

Порівняння фасувальних машин

Назва	CD-30	MA-400	C 2155
Країна виробник	Китай	Італія	Германія
Бренд	CHENGDA	Marchesini Group S.p.A.	Uhlmann
Габарити	4100×1580×2000	Не вказано	1450×1600×3600
Продуктивність	100 коробок/хв	400 коробок/хв	150 коробок/хв
Джерело	[162]	[163]	[164]

Для ретельного підбору варто спочатку визначити кількість коробок, яку будемо отримувати на виході. В одну коробку вкладається 5 флаконів, тоді кількість коробок становитиме:

$$\frac{113\,680}{5} = 22\,736 \text{ коробок}$$

Отже, для ефективного використання пропонується обрати фасувальну машину С 2155, яка робить 150 коробок/хв, оскільки при використанні автомату МА-400 машина буде працюватиме менше години і далі просто стояти.

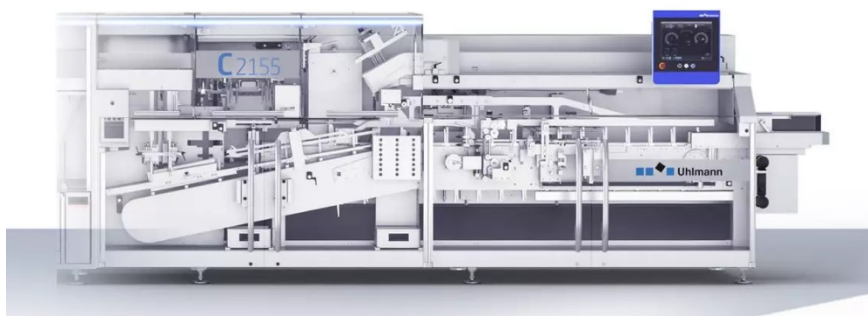


Рис.9.5. Картонер С 2155 [164]

Через велику кількість коробок треба також перебачити машину групового пакування. Порівняння машин групового пакування показано в табл.9.6.

Таблиця 9.6.

Порівняння машин групового пакування

Назва	CP/WA	RS	RDM-SD
Країна виробник	Фінляндія	Італія	Франція
Бренд	Orfer	Ilpra	JR MARUANI
Габарити	2800×1000×2150 мм	3060×1934×2061 мм	3500×1700×1900 мм
Продуктивність	10 коробок/хв	15 коробок/хв	120 коробок/хв
Джерело	[165]	[166]	[167]

Пропонується вкладати 100 коробок препарату в 1 коробку, тоді на виході отримаємо близько 228 коробок. Отже, пропонується опрати апарат RS, який пакує по 15 групових коробок/хв. Тоді, наше обладнання буде працювати близько 15 хвилин.



Рис.9.6. Машина групового пакування RS [166]

РОЗДІЛ 10

МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ПРОБІОТИЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

Варто зазначити, що втрати препарату відбуваються ще на етапі зважування допоміжних речовин для оральної суспензії. З врахуванням похибки дозуючого обладнання, втрати на цій стадії становитимуть близько 0,3%. Також, на втрати допоміжних речовин будуть впливати дозуючі насоси, які перекачують розчин до пробіотичної суспензії. З врахуванням похибки цього обладнання, втрати на цій стадії становитиме 0,2%.

Після перемішування, наступна стадія втрат препарату припадає на його розлив. Похибка дозування BFS - ASEP-TECH® MODEL 640 становить до 0,5%, тому вважаємо, що втрата на цій стадії становитиме 0,5%.

Загальна кількість втрат становить 1%. Наприкінці маємо отримати 112 962 флаконів, заповнені оральною суспензією в об'ємі по 1 мл на флакон.

Таблиця 10.1.

Матеріальний баланс флаконів пробіотичного пепарату з гіпохолестеринемічним ефектом

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, кг	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, кг
1	2	3	4
Зважування сировини, кг			
Глюкоза	5,66	Глюкоза	5,64
Стеарат магнію	5,66	Стеарат магнію	5,64
Манітол	2,27	Манітол	2,26
Всього без врахування втрат	13,59 кг	Втрати (0,3%)	0,05
		Всього з втратами:	13,54 кг

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 10 МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ПРОБІОТИЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ	Лім.	Арк.	Архувів
Перевір.		Старовойтова С.В.					104	127
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Перекачування розчинів допоміжних речовин до пробіотичної суспензії, л			
Розчин глюкози	30,04 л	Готова пробіотична суспензія	113,53 л
Розчин стеарату магнію	83,04 л		
Пробіотична біомаса	0,68 кг		
Всього без врахування втрат	113,76 л	<u>Втрати (0,2%)</u>	<u>0,23 л</u>
		Всього з втратами:	113,53 л
Наповнення флаконів			
Готовий лікарський препарат	113,53 л	Наповнення флаконів	112 962 шт.
Флакони	113 530 шт.		
Всього без врахування втрат	113 530 флаконів	<u>Втрати(0,5%)</u>	<u>568 шт</u>
		Всього з втратами	112 962 флаконів

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

Таблица 11.1.

Специфікація обладнання виробництва пробіотику

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Металевий повітрозабірник висотою 20 метрів виконаний зі сталі нержавіючої, оснащений металевою сіткою для затримки великих смітєвих частинок.
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Панельний фільтр грубої очистки. Клас очистки – G4. Габарити: 592x592x292 мм. Робоча температура до 80 °С. ¹
В-3	Вентилятор повітря	1	Відцентровий вентилятор DUNDAR CA 10.2. Продуктивність – до 160 м ³ /год. Корпус виготовлено з високоякісного алюмінію. ²
К-4	Калорифер	1	Електричний калорифер НК 100-0,6-1. Продуктивність до 60 м ³ /год. Корпус виготовлено з високоякісного алюмінію. ³
П-5	Парозволожувач	1	Парозволожувач RDL 100. Продуктивність до 100 м ³ /год. Корпус виготовлено зі сталі нержавіючої. ⁴
Ф-6	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр тонкого очищення камерного типу. Клас очистки – F7. Габарити: 287x592x600 мм. Оцинкована стальна рама. ⁵
Ф-7	Фільтр надочищення	1	Панельний НЕРА фільтр. Клас очистки – H13. Габарити: 305x610 x 292 мм. Матеріал фільтрування – міроскляні волокна. ⁶
Д-8 Д-24	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор рідинний. Продуктивність до 9999 л. Похибка дозування не більше 0,5%. ⁷
Ф-9	Піщаний фільтр	1	Фільтр високої продуктивності механічної фільтрації мішочного типу ВРН-1. Продуктивність – 20 м ³ /год. Корпус – сталь нержавіюча 304. ⁸
Ф-10	Фільтр вугільний	1	Фільтр вугільний промисловий PF-4272. Продуктивність – від 10 до 18 м ³ /год. Корпус – поліетилен. ⁹

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ112							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Костенко К.В.				РОЗДІЛ 11			Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.		Старовойтова С.В.				СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ						
						ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ				106	127	
Реценз.						СУСПЕНЗІЇ З			Кафедра БТМ			
						ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ						
Н. Контр.						БАКТЕРІАМ						

Закінчення табл.11.1.

3-11 3-15	Збірник для пом'якшення води	1	Реактор об'ємом 2000 л. Матеріал – сталь нержавіюча 316. Оснащений подвійною сорочкою, перемішуючим пристроєм, датчиком температури. Габарити: 2500x1900x1650 мм. ¹⁰
Н-12	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий К 20/30. Продуктивність - 20 м ³ /год. Частота обертів – 2900 об/хв. Робоча температура – від 0 до 85 °С. ¹¹
Ф-13	Фільтр натрій-катіонітний	1	Фільтр натрій-катіонітний ФПА І. Продуктивність – до 20 м ³ /год. Корпус – сталь нержавіюча. ¹²
ЗО-14	Установка зворотнього осмосу	1	Промисловий зворотний осмос Nereh MPRO582. Продуктивність 4,6-5,7 м ³ /год. Кількість мембран – 5 шт. Габарити: 2700x800x1600. ¹³
Н-16 Н-23	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний BSR 1000/1.0. Продуктивність 990 л/год. Матеріал насосу – сталь нержавіюча AISI 304. ¹⁴
БФС-17	Система BFS	1	ASEP-TECH®MODEL 640. Продуктивність – 18000 флаконів/хв. Габарити: 2100x5160x3050 мм. Може виробляти флакони від 0,4 до 1000 мл. ¹⁵
І-18	Інспекційна машина для флаконів	1	Інспекційна машина IVEN -11. Продуктивність – 12000 флаконів/хв. Габарити: 2980x2000x2100 мм. ¹⁶
Е-19	Етикувальна машина для флаконів	1	Етикувальна машина ZS-TB823. Продуктивність – 100-300 флаконів/хв. Габарити: 1430x1580x1590 мм. ¹⁷
Ф-20	Фасувальна машина	1	Картонер С 2155. Габарити:1450x1600x3600. Продуктивність - 150 коробок/хв. ¹⁸
Г-21	Машина групової упаковки	1	Автоматична машина групової упаковки RS. Продуктивність - 15 коробок/хв. Габарити: 3060x1934x2061 мм. ¹⁹
3-22	Збірник з субстанцією лікарського засобу	1	Реактор об'ємом 150 л, оснащений подвійною сорочкою, та виконаний зі сталі нержавіючої. Має перемішуючий пристрій. ²⁰

Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy/>, 2 - <https://ovk.ua/ua/shop/product/dundar-ca-10-2>, 3 - https://fastair.com.ua/ru/elektricheskij-kanalnyj-nagrevatel-vozduha-nk-100-0,6-1?gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPk_IJLpitDnIBITF0JQtPVE659nWcTwLfwlk_h3TmIOTi8eXQwteoRoC3qQQAyD_BwE, 4 - https://alpha-matic.com.ua/p1796815920-refrizheratornyj-osushitel-rdl.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPkI8K-jr_XIpg0qtW_805y0JHzUX9gukR4GpBk3IJ27SUjJ8eeSa9hRoCC6QQAyD_BwE, 5 - <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyj-filtr-287kh592kh600-4-f6/>, 6 - <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-305610292-h11-fias>, 7 - https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwIYCKBhAOEiwA5aN4AdumWFEY2RL0-

[cNrZT3uZkgCr2bFthPIO8Hu_8dXLER8eHQj2BaSFxoCqgIQAvD_BwE,](https://svitpoluvy.com.ua/ua/p1901996817-filtry-vysokoj-proizvoditelnosti.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPvixMKzl_h1ZTkJTeFOSMlhGhiacZ7X7N-nxZR0ObdInAIb37choClg8QAvD_BwE) 8 -
[https://svitpoluvy.com.ua/ua/p1901996817-filtry-vysokoj-](https://svitpoluvy.com.ua/ua/p1901996817-filtry-vysokoj-proizvoditelnosti.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPvixMKzl_h1ZTkJTeFOSMlhGhiacZ7X7N-nxZR0ObdInAIb37choClg8QAvD_BwE)
[proizvoditelnosti.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1-](https://svitpoluvy.com.ua/ua/p1901996817-filtry-vysokoj-proizvoditelnosti.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPvixMKzl_h1ZTkJTeFOSMlhGhiacZ7X7N-nxZR0ObdInAIb37choClg8QAvD_BwE)
[6sBhAoEiwArqlGPvixMKzl_h1ZTkJTeFOSMlhGhiacZ7X7N-nxZR0ObdInAIb37choClg8QAvD_BwE,](https://activcarbon.com.ua/uk/product-category/water-filters-uk/ugolnyye-filtry-uk/) 9 -
[https://activcarbon.com.ua/uk/product-category/water-filters-uk/ugolnyye-filtry-uk/,](https://activcarbon.com.ua/uk/product-category/water-filters-uk/ugolnyye-filtry-uk/) 10 -
[https://www.alibaba.com/product-detail/2000L-stainless-steel-jacketed-reactor-](https://www.alibaba.com/product-detail/2000L-stainless-steel-jacketed-reactor-epoxy_60314591557.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.25.7dc523b0nfU9KC)
[epoxy_60314591557.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.25.7dc523b0nfU9KC,](https://www.alibaba.com/product-detail/2000L-stainless-steel-jacketed-reactor-epoxy_60314591557.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.25.7dc523b0nfU9KC) 11 -
[http://mei.org.ua/nasos-k2030/,](http://mei.org.ua/nasos-k2030/) 12 - [https://expresenergo.com.ua/p159934811-filtry-natrij-kationitovye.html,](https://expresenergo.com.ua/p159934811-filtry-natrij-kationitovye.html) 13
- [https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html,](https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html) 14 - [https://bts.net.ua/pumping-](https://bts.net.ua/pumping-equipment-distillery/acid-pumps-sjp/bsr-1000-10-aisi-304-plunzherniy-dozuyuchiy-nasos/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPizm0cppsh9rlZCFcW7z1YQVJ3tnCLEWYmQITBYGl-mQ9zC1L1SAhoCNSEQAvD_BwE)
[equipment-distillery/acid-pumps-sjp/bsr-1000-10-aisi-304-plunzherniy-dozuyuchiy-](https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html)
[nasos/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA1-](https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html)
[6sBhAoEiwArqlGPizm0cppsh9rlZCFcW7z1YQVJ3tnCLEWYmQITBYGl-](https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html)
[mQ9zC1L1SAhoCNSEQAvD_BwE,](https://hydro.in.ua/ua/p1663002996-promyshlennyj-obratnyj-osmos.html) 15 - [https://www.weilerengineering.com/asep-tech/model-640,](https://www.weilerengineering.com/asep-tech/model-640) 16 -
[https://ivenpharmatech.en.made-in-china.com/product/NnHUCAeuEvVy/China-Automated-Visual-Inspection-](https://ivenpharmatech.en.made-in-china.com/product/NnHUCAeuEvVy/China-Automated-Visual-Inspection-Machine-High-Quality-Light-Inspection-Machine-for-Vial-Syrup-and-Ampoule-Bottles.html)
[Machine-High-Quality-Light-Inspection-Machine-for-Vial-Syrup-and-Ampoule-Bottles.html,](https://ivenpharmatech.en.made-in-china.com/product/NnHUCAeuEvVy/China-Automated-Visual-Inspection-Machine-High-Quality-Light-Inspection-Machine-for-Vial-Syrup-and-Ampoule-Bottles.html) 17 -
[https://www.alibaba.com/product-detail/Plastic-Bottles-Labeling-Machine-ZONESUN-](https://www.alibaba.com/product-detail/Plastic-Bottles-Labeling-Machine-ZONESUN-ZS_62075878027.html?s=p)
[ZS_62075878027.html?s=p,](https://www.alibaba.com/product-detail/Plastic-Bottles-Labeling-Machine-ZONESUN-ZS_62075878027.html?s=p) 18 - [https://www.bickelwolf.cz/files/lieferanten/UHLMANN/documents/engl-](https://www.bickelwolf.cz/files/lieferanten/UHLMANN/documents/engl-cartonerc2155.pdf)
[cartonerc2155.pdf,](https://www.bickelwolf.cz/files/lieferanten/UHLMANN/documents/engl-cartonerc2155.pdf) 19 - <https://www.medicalexpo.com/prod/ilpra/product-129227-1089475.html> , 20 -
<https://www.medicalexpo.com/prod/ilpra/product-129227-1089475.html>
[https://www.alibaba.com/product-detail/150L-Jacket-Reactor-Stirred-Tank-](https://www.alibaba.com/product-detail/150L-Jacket-Reactor-Stirred-Tank-Reactor_1600637587060.html)
[Reactor_1600637587060.html](https://www.alibaba.com/product-detail/150L-Jacket-Reactor-Stirred-Tank-Reactor_1600637587060.html)

РОЗДІЛ 12

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГПХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається з висоти 20 метрів за допомогою труби ПЗ-1. Тиск повітря в трубі низький, він становить від 0,01 до 0,03 атмосферного тиску.

ДР 1.2. Перший ступінь очищення повітря

Першим етапом очищення повітря є фільтри грубого очищення (Ф-2). Вони затримують великі частинки пилу, краплі вологи та деякі мікроорганізми. Коефіцієнт проскоку твердих частинок не перевищує 10%. Потім повітря подається вентилятором (В-3) на електрокалорифер (К-4). Там воно нагрівається до температури 24 °С. Якщо потрібно охолодити повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як випарник. Він забирає теплоту у повітря, і воно охолоджується. Температура повітря при цьому знижується. Якщо потрібно нагріти повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як конденсатор. Він віддає теплоту повітрю, і воно нагрівається. Нагріте або охолоджене повітря надходить на парозволожувач (П-5). Там воно зволожується до ступеня $W=60\%$.

ДР 1.3. Другий ступінь очищення повітря

Після зволоження на парозволожувачі (П-5) повітря надходить на фільтр тонкої очистки (Ф-6). Фільтр має велику площу поверхні, на якій накопичуються дрібні частинки розміром до 0,1 мікрона. Фільтри тонкого очищення (Ф-6) використовуються для другого етапу очищення повітря, вони видаляють до 99,97% всіх часток розміром від 0,1 до 0,3 мікрона.

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костенко К.В.			РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГПХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ		Літ.	Арк.
Перевір.		Старовойтова С.В.						109
Реценз.								127
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.4. Третій ступінь очищення повітря

Згідно з апаратурної схемою, повітря після фільтрації тонкої очистки (Ф-6)

надходить на фільтр типу HEPA у класі чистоти В (Ф-7). Фільтр HEPA (High Efficiency Particulate Air) є високоефективним фільтром, який затримує 99,9997% частинок розміром до 0,22 мікрона.

ДР 2. Одержання води очищеної

Воду одержуємо з метою миття технологічного обладнання, тому маємо передбачити доволі великий об'єм.

ДР 2.1. Механічна фільтрація

Очищення водопровідної води (1600 л) від механічних домішок здійснюється на піщаних фільтрах (Ф-9). За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-8) на піщаний фільтр (Ф-9) подається 1600 л води водопровідної. Піщані фільтри є одним з найпоширеніших методів очищення води від механічних домішок. Вони складаються з шару піску, який затримує частинки розміром понад 5 мкм.

ДР 2.2. Глибинна фільтрація

Після очищення водопровідної води від більших механічних домішок на піщаних фільтрах (Ф-9) вона проходить додаткове очищення на вугільних фільтрах (Ф-10). Вугільні фільтри мають більш дрібну структуру, ніж піщані, і можуть затримувати частинки розміром 1-3 мкм.

ДР 2.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюється діалізом. Вода подається до збірнику (З-11). Встановлюється температура кипіння – 100 °С, тривалість кип'ятіння – 1 година. Після цього, не чекаючи охолодження, до води додають 204 г оксиду кальцію та 132 г харчової соди. Суміш перемішують протягом 30 хвилин, після чого, за допомогою відцентрового насоса (Н-12) вода пом'якшена подається на натрій-катіонітний фільтр (Ф-13) для додаткового видалення нерозчинних осадів.

ДР 2.4. Зворотній осмос для видалення зайвих солей

Профільтрована вода потрапляє до установки зворотнього осмосу (ЗО-14). Вода проходить напівпроникні мембрани, звільняючись від зайвих солей. Тривалість фільтрування – 1 година. Одержана вода подається до збірника (З-15). Коли вода буде необхідна, вона подається до обладнання за допомогою перистальтичного насосу (Н-16).

ТП 3. Видування, наповнення та запаювання флаконів

Оскільки лікарський препарат одержується на стадії підготовки лікарської субстанції (окрема технологічна та апаратурна схема), воно автоматом подається до системи BFS.

До апарату (БФС-17) подається гранульована пластмаса EVA. Внутрішній екструдер починає переплавляти гранули в пластикові трубочки. В відкритий отвір форсунок (оскільки форма розрахована одразу на формування та з'єднання 5 флаконів) подаються одержані пластикові трубочкам, які опускаються в прес-форму. Нижня частина трубочок запаюється, після чого, до них подається повітря, яке нагрівається у відповідному модулі БФС-17, та починає формувати флакони відповідно до пресс-форми. Після формування основи флаконів повітря видаляється, а через форсунку розливу подається субстанція лікарського засобу (оскільки підготовку цієї субстанції показано в розділі 7, для покращення розуміння процесу збірник з субстанцією (З-22) буде продубльовано на апаратурній схемі виробництва лікарського засобу). Флакони наповнюються по 1 мл. Після того, як наповняться 5 з'єднаних флаконів, наступна прес-форма запаює верхню частину наповнених флаконів, формуючи герметичний флакон з кришкою. Тривалість операції – 7 годин. Одержані з'єднані флакони подаються на наступну стадію за допомогою з'єднувального конвеєру.

ТП 4. Інспекція флаконів на герметичність та механічні включення

Флакони з минулої стадії подаються до інспекційної машини (І-18) за допомогою конвеєру. Спочатку, флакони перевіряються на герметичність шляхом подачі повітря під надлишковим тиском 0,6 МПа від ДР 1.7. Нагнітач повітря встановлено в самій інспекційній машині. Після цього, герметичні флакони

потрапляють до світлового модуля, де оптичний прилад перевіряє їх на різноманітні включення. Тривалість перевірки становить – 10 годин. Після цього, конвеєром, перевірені флакони потрапляють на наступну стадію.

ПМФ 5. Марування, фасування, пакування

ПМФ 5.1 Поклейка етикеток на флакони

За допомогою конвеєру до етикувальної машини (Е-19) потрапляють готові флакони з лікарським засобом. На відповідну бабину чіпляють рілонну стрічку з клейовими етикетками, які містять інформацію про назву препарату, вміст діючої речовини, реєстраційний номер препарату, дату виготовлення та дату закінчення терміну придатності. Машина вертикального типу клеїть етикетки одразу на 5 з'єднаних флаконів. Тривалість етикування становить – 7 год. Після чого, проетиковані флакони конвеєром переносяться до фасувального апарату.

ПМВ 5.2 Фасування флаконів у коробки

Конвеєром проетиковані флакони потрапляють до фасувальної машини (Ф-20). Машина складає картонні заготовки, з відповідною інформацією та вкладає в них заготовки з 5 з'єднаних пластикових флаконів та інструкцію в кожну коробку, після чого її закриває. Також, апарат на готовий лікарський препарат наносить інформацію про номер реєстрації препарату, номер серії, його дату виготовлення та дату закінчення терміну придатності. Тривалість фасування складає – 3 год. Після цього, готові коробки лікарського препарату подаються на групове пакування.

ПМВ 5.3 Групове пакування лікарського препарату

Конвеєром до машини групового пакування (Г-21) подаються коробки лікарського препарату. Автомат вкладає по 100 коробок лікарського препарату в картонну коробку, яку попередньо самостійно складає. Після цього, машина заклеює коробку скотчем. Тривалість пакування становить 20 хв. Після одержання групових коробок, уповноважена особа наносить інформацію за допомогою штампу щодо назви препарату, його серії та дати виготовлення. Коробки відправляються на склад на зберігання при температурі нижче 4 °С.

РОЗДІЛ 13
ОПИС ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З
ГПХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ЗГІДНО АНД

Оскільки запропонованого препарату ще не існує на світовому ринку, пропонується йому надати назву «ПроХолест». Тому, в проекті АНД в подальшому буде фігурувати саме ця назва.

Аналітично нормативна документація поширюється на медичний імунобіологічний препарат ПроХолест, який являє собою оральну суспензію, що містить живі клітини *Weissella cibaria* SCCB2306 з додаванням стабілізатора та консерванту.

Склад:

Діючі речовини:

В одній дозі (флаконі) міститься 10^8 КУО/мл молочнокислих бактерій *Weissella cibaria* SCCB2306

Допоміжні речовини:

Глюкоза (ДСТУ 4464:2005)

Магнію стеарат (ГОСТ 32770-2014)

Манітол (ДСТУ EN 15086:2009)

Вода очищена (ДСТУ 7525:2014)

Призначення. Гостра інфекційна діарея у дітей та дорослих; профілактика та лікування діареї й колітів, обумовлених антибіотикотерапією; попередження діареї; лікування та профілактика атеросклерозу.

Форма випуску. Флакони по 1 мл №5

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 13 ОПИС ПРОБІОТИЧНОЇ СУСПЕНЗІЇ З ГПХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНИМ ЕФЕКТОМ ЗГІДНО АНД				Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Костенко К.В.										113	127
Перевір.	Старовойтова С.В.											
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											
					Кафедра БТМ							

Специфікація ПроХолест

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис	Продовгуваті, пластикові, напівпрозорі, білі флакони з запаяним верхом, що містять рідку суспензію світлого кольору	За п. 1 АНД, візуально
Автентичність	<i>W. cibaria</i> являють собою короткі палички 0,5–0,6 мкм завширшки та 1,2–2,5 мкм завдовжки. Грампозитивні. Факультативні анаероби.	За п. 2 АНД, бактеріологічно, бактеріоскопічно
Прозорість	Суміш має бути непрозорою	За п. 3 АНД, Візуально
Забарвлення	Препарат повинен мати білий напівпрозорий колір	За п. 4 Візуально
pH	6,8 - 7,2	За п. 5 ДФУ, вид. 1, р.2.2.3, потенціометрично
Мікробіологічна чистота	Відсутність сторонньої мікрофлори, сторонніх дріжджів та пліснявих грибів	За п.6 АНД, ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, р. 2.6.13, N
Специфічна нешкідливість	Має бути нешкідливим	За п. 7. АНД
Специфічна активність - визначення кількості молочнокислих бактерій в 1 дозі препарату; - визначення антагоністичної активності препарату - визначення гіпохолестеринемічної дії препарату	В одній дозі препарату повинно міститися не менше 10^8 живих клітин <i>W. cibaria</i> Має пригнічувати патогенну та умовно-патогенну мікрофлору Має асимілювати $78 \pm 3\%$ холестерину	За п.8 АНД За п.8.1 АНД За п.8.2 АНД За п.8.3 АНД

Герметичність	Флакони з препаратом мають бути герметичними	За п.9
Маркування	На кожному флаконі зазначають назву препарату, об'єм дози, номер серії, термін придатності	За п.10, ТУ У 42.34.011-97
Транспортування	Транспортування здійснюють у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2 - 8 °С	За п.11, ГОСТ 7768-90

Методи контролю

ПроХолест

1. Опис

Продовгуваті, пластикові, напівпрозорі, білі флакони з запаяним верхом, що містять рідку суспензію світлого кольору з характерним запахом. Визначають візуально та органолептично.

2. Автентичність

W. cibaria являють собою короткі палички 0,5–0,6 мкм завширшки та 1,2–2,5 мкм завдовжки. Грампозитивні. Факультативні анаероби. Визначають бактеріоскопічно [168].

3. Прозорість

Суміш має бути не прозорою. Визначають візуально.

4. Кольоровність

Суміш препарату повинна мати білий напівпрозорий колір. Визначають візуально.

5. рН

6,8 - 7,2. Оскільки препарат рідкий, його рН визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.3, потенціометрично [169].

pH — число, яке умовно характеризує концентрацію іонів водню у водних розчинах. На практиці pH визначають експериментально. pH випробовуваного розчину пов'язане з pH стандартного розчину (pH_s) таким рівнянням:

$$pH = pH_s \frac{E - E_s}{k}$$

де: E — потенціал електрода у випробовуваному розчині, у вольтах; E_s — потенціал того ж електрода в розчині з відомим pH (pH_s), у вольтах. k — температурний коефіцієнт, що дорівнює зміні потенціалу при зміні значення pH на одиницю, виражений у вольтах, який розраховують за рівнянням Нернста.

Потенціометричне визначення pH проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий - електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у 100 разів більшим за опір використовуваних електродів. Прилад звичайно градується в одиницях pH і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0.05 одиниць pH або 0.003 В.

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Якщо необхідно, враховують температурні поправки відповідно до інструкції підприємства-виробника. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату.

Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням pH не мають відрізнятися більше як на 0.05 одиниць pH від табличного значення pH цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють pH у тих самих умовах, що і для буферних розчинів.

Якщо прилад використовують часто, його калібрування проводять регулярно. У противному разі калібрування приладу має проводитися перед кожним виміром.

Усі випробовувані розчини і стандартні буферні розчини мають бути приготовані на воді, вільній від діоксиду та вуглецю.

6. Мікробіологічна чистота

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та сторонніх дріжджеподібних грибів. Визначають згідно з ДФУ 2.6.12, доп. 1, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42 [169].

Зразок лікарського засобу у кількості 10 мл поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі №1 інкубують при 30–35 °С для виявлення бактерій, а посіви з середовищем №2 – при 20–25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають на рідких поживних середовищах: №3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 год. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

У випадку виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту

мікроорганізмів при повторному висіві досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію препарату бракують.

Пропис поживних середовищ:

Молочний агар (г/л) [170]:

Казеїн ферментний гідролізат	20,0
Дріжджовий екстракт	5,0
Желатин	2,5
Декстроза	5,0
Лактоза	5,0
Сахароза	5,0
Натрію хлорид	4,0
Ацетат натрію	1,5
Аскорбінова кислота	0,5
Агар	15,0

Агар Рака-Рея (г/л) [171]:

N-ацетил глюкозамін	0,5
Агар	17,0
Бетаїну гідрохлорид	2,0
Казеїну ферментний гідролізат	20,0
Діамоній гідрогенцитрат	2,0
Фруктоза	5,0
Глюкоза	5,0
Печінковий концентрат	1,0
Сульфат магнію	2,0
Мальтоза	10,0
Сульфат марганцю	0,66
Монокалій фосфат	2,0
Калію аспартат	2,5

Глутамат калію	2,5
Дріжджовий екстракт	5,0
Агар BD LBS (г/л) [172]:	
Панкреатичний гідролізат казеїну	10,0
Натрію ацетат гідрат	25,0
Дріжджовий екстракт	5,0
Оцтова кислота	1,3
Калій дигідрофосфат	6,0
Сульфат магнію	0,575
Цитрат амонію	2,0
Сульфат марганцю	0,12
Глюкоза	20,0
Сульфат заліза	0,034
Полісорбат 80	1,0
Агар	15,0

7. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей для введенні його перорального в кількості однієї дози [169].

Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14–16 г (зважування проводять безпосередньо перед дослідом).

Кожній з 5-ти мишей вводять 1 мл препарату перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб.

Всі тварини повинні залишитися живими та не втратити у вазі.

У випадку загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втраті у вазі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію препарату бракують.

8. Специфічна активність

Специфічна активність препарату визначається за кількістю життєздатних клітин молочнокислих бактерій в одній дозі препарату, антагоністичною та гіпохолестеринемічною активністю [169].

В одній дозі препарату повинно міститися не менше 10^8 життєздатних клітин *W. cibaria*. Визначення проводять за п. 8.1 АНД «Визначення кількості живих *W. cibaria* в одній дозі препарату».

Антагоністична активність перевіряється проти *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* та *Escherichia coli*. Визначення цього показнику проводять за п. 8.2. АНД «Визначення антагоністичної активності препарату».

8.1. Визначення кількості живих молочнокислих бактерій в одній дозі препарату

Визначення кількості живих молочнокислих бактерій в одній дозі препарату проводять на трьох зразках препарату від кожної серії [169].

Кількість живих молочнокислих бактерій в одній дозі препарату перевіряють паралельно з робочим стандартним зразком (РСЗ) ПроХолест.

РСЗ ПроХолест – живі клітини *Weissella cibaria* SCCB2306 та містить 10^8 живих мікробних клітин в одному флаконі. Зберігати при температурі 6 ± 2 °C.

1 мл препарату та РСЗ по 1 мл переносять у пробірки, що містять по 9 мл МРС агару, перемішують шляхом 12–15 кратного прокачування, отримуючи при цьому 1 дозу *W. cibaria* SCCB2306 в об'ємі 10 мл середовища (розведення 10^{-1}). З цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення до 10^{-8} . Пробірки з розведеннями досліджуваних зразків препарату та РСЗ у поживних середовищах поміщають в термостат при температурі (37 ± 1) °C і інкубують протягом 2-х діб. Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких є ріст молочнокислих бактерій у вигляді світлих, білих, блискучих, круглих колоній.

Кількість живих *W. cibaria* SCCB2306 N в одній дозі визначають за формулою:

$$N = n \times 10^{m-1}$$

де n – кількість колоній в одній пробірці;

m – величина розведення мікробної суспензії.

В першу чергу враховують результат в ряду розтитровування РСЗ. Якщо ріст бактерій спостерігається в розведенні не менше, ніж 10^{-8} , це свідчить про задовільні ростові властивості поживного середовища та достовірність результатів аналізу.

Якщо в ряду розведень РСЗ ріст спостерігається в розведенні меншому, ніж 10^{-8} , то дослід необхідно повторити на іншій серії поживного середовища. Препарат вважають придатним, якщо ріст бактерій в ряді десятикратних розведень досліджуваного препарату відмічається не менше, ніж у пробірці з розведенням 10^{-8} , що відповідає вмісту 10^8 КУО живих клітин в одній дозі.

Якщо вміст живих клітин в одній дозі досліджуваного препарату менше, ніж 10^8 КУО, а в 1 мл РСЗ – 10^8 КУО, тоді контроль необхідно повторити на подвоєній кількості зразків.

Якщо при повторному контролі показники РСЗ відповідають пред'явленим вимогам, а показники досліджуваного препарату нижче, то серію препарату бракують.

8.2. Визначення антагоністичної активності препарату

Штами бактерій засівають «газоном» у товщі МРС агару. Для цього 1 см^3 бактеріальної суспензії з у стерильну чашку Петрі, вносять 15-20 см^3 розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища [169].

Вирощування здійснюють в аеробних умовах за температури 37°C упродовж 48 год, після чого агаровий блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (або будь-яким іншим, придатним для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури.

Засіяні чашки інкубують за температури 37 °C упродовж 72 год . Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами з он затримки росту, мм : 5-15 - малочутливі; 15-20 - помірно чутливі; 20-30 - чутливі; 30-40 - високочутливі.

8.3. Визначення гіпохолостеринемічного ефекту

Попередньо, відбирають 1 мл препарату та розчиняють його в 9 мл стерильної води. Розчин висівають на МРС агар та ставляють в термостат при 37 °C на 48 год. Після цього, одну колонію інокують у 10 мл бульйону MRS, доданого 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину та інкубують при 37 °C протягом 24 годин. *E. coli* OP50 (негативний контроль) вирощують в бульйоні LB, доданому оксалом і водорозчинним холестерином, і інкубують при 37 °C протягом 24 годин. Клітини збирають центрифугуванням при 10000×g протягом 5 хвилин при 4 °C. Для приготування клітин, убитих теплом, осад клітин суспендують в дистильованій воді (10 мл) і автоклавують при 121 °C протягом 15 хвилин. Мертві клітини суспендують в бульйоні МРС, доданому 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину, та інкубували при 37 °C протягом 24 годин. Для клітин у стані спокою осад клітин суспендували в 10 мл стерильного 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,8), що містить 0,5% оксгалу та 0,1 г/л водорозчинного холестерину. Клітини інкубують при 37 °C протягом 24 годин. Один мілілітр кожного супернатанту додають до 2 мл 33% гідроксиду калію та 3 мл 95% етанолу. Суміш перемішують протягом 30 с і нагрівають протягом 10 хв на водяній бані при 60 °C. Суміші дають охолонути до кімнатної температури (26 °C) і змішують з 5 мл гексану, після чого додають 1 мл дистильованої води. Пробірки залишають на 10 хвилин при кімнатній температурі для відділення органічної фази від водної. Гексанову фазу (3 мл) переносять в чисту пробірку і випарюють в струмі азоту. Чотири мілілітри свіжоприготованого О-фталевого альдегіду (0,5 мг О-фталевого альдегіду/мл оцтової кислоти) змішують з концентрованою фазою і залишають на 10 хвилин при кімнатній температурі. До суміші додавали концентровану сірчану кислоту (2 мл) і

перемішували протягом 1 хв. Поглинання зчитували при 550 нм за допомогою спектрофотометра [139].

9. Герметизація

10 рандомних флаконів занурюють в ексикатор заповнений підфарбованою водою (червоного кольору) та залишають протягом 1 години. Флакони вважаються герметичними, якщо їх вміст не отримав червоного забарвлення.

10. Пакування

По 5 флаконів препарату та інструкцію з його використанням викладають у пачку за ГОСТ 64-071-89 з картону коробкового (хромерзац) за ГОСТ 7933-89 з перегородками або гофрованою вкладкою, або з полімерною вкладкою з плівки полівінілхлоридної для розміщення та фіксації флаконів.

На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 або паперу для письма за ГОСТ 18510-87, або етикетку на липкій основі.

11. Маркування

На флакон за ТУ У 42.34.011-97 наносять етикетку, яка містить: назву препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності.

12. Транспортування

Препарат транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2 – 8 °С відповідно до ГОСТ 7768-90.

Біологічний агент та біологічні тест-системи. Виробничі штами.

Виробничий штам бактерій, належить до виду *Weissella cibaria*, роду *Weissella*, родини *Lactobacillaceae* [173].

Контроль штаму проводять при надходженні кожної серії виробничого штаму.

Штам *Weissella cibaria* - являють собою короткі палички 0,5–0,6 мкм завширшки та 1,2–2,5 мкм завдовжки. Грампозитивні. Факультативні анаероби. На агарі утворюють світлі, білі, блискучі, круглі колонії [173].

Штами *W. cibaria* гідролізують аргінін і виробляють як d, так і l енантіомер молочної кислоти як кінцевий продукт ферментації глюкози. CO₂ також утворюється в результаті метаболізму глюкози. Кислота утворюється з арабінози, целобіози, саліцину, сахарози та ксилози, але не з галактози, лактози, мелібіози, рафінози, рибози та трегалози [173].

Оптимальна температура для росту (37±1)°C [173].

Показники антагоністичної активності виробничого штаму сахароміцетів на чашках Петрі з МРС середовищем, виражених в міліметрах зон пригнічення росту тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* та *Escherichia coli* з методу агарових блоків, повинні бути не менше 15 мм [173].

Тест-культури повинні знаходитися у S-формі і мати типові для даного виду морфологічні, ферментативні властивості та вірулентність, яка визначається для мікробів кишкової групи величиною LD₅₀ при внутрішньочеревному зараженні білих мишей [174].

Кількість живих клітин в одній дозі повинна бути не нижче 10⁸.

Виробничий штам молочнокислих бактерій має бути безпечним для білих мишей при пероральному введенні його в кількості, що відповідає одній дозі (флакону) ПроХолест.

Фармакологічні властивості.

Код АТС. С10А Х19 [175]**

Імунологічні та біологічні властивості. ПроХолест сприяє відновленню нормальної мікрофлори кишечника, чинить виражену етіопатогенетичну антидіарейну дію. Рекомендовані при лікуванні та профілактиці атеросклерозу.

Головні механізми дії *Weissella cibaria*: витягують холестерин із кишечника шляхом включення в клітинну мембрану та перетворюють холестерин у копростанол, який потім виводиться з фекаліями, потенційно знижуючи всмоктування холестерину в кишечнику.

ферментативна активність зумовлена підвищенням активності дисахаридаз тонкого кишечника (лактази, сахарази, мальтази);

трофічний ефект відносно слизової оболонки тонкого кишечника внаслідок вивільнення сперміну і спермідину.

Генетично зумовлена стійкість *Weissella cibaria* до дії антибіотиків дозволяє застосовувати їх одночасно з антибіотиками для захисту нормального мікробіоценозу травного тракту.

Показання до застосування. ПроХолест призначений для профілактики та лікування дорослих та літніх людей від атеросклерозу.

ПроХолест призначають в наступних випадках:

профілактика і лікування колітів та діареї, пов'язаних із прийомом антибіотиків

дисбіоз кишечника

гостра та хронічна бактеріальна діарея

гостра вірусна діарея

діарея мандрівника

синдром подразненого кишечника

діарея, пов'язана з довгостроковим ентеральним харчуванням

атеросклероз

Способи застосування та дози. Препарат застосовують внутрішньо, випиваючи його з флакону або розводячи його у невеликій кількості рідини.

Дорослим та літнім людям вживати 1 дозу на день протягом 7 тижнів.

Важливо! Дозу та термін лікування визначає лікар залежно від характеру та перебігу захворювання.

Рекомендовані терміни лікування:

гостра діарея: 3–5 діб.

лікування дисбіозу, хронічного діарейного синдрому, синдрому подразненого кишечника: 10–14 діб.

профілактика та лікування антибіотикоасоційованої діареї та псевдомембранозного коліту: ПроХолест приймати у схемах разом з антибіотиком з першого дня застосування до кінця лікування антибіотиком.

діарея мандрівника: по 1 дозі на добу. Застосування слід розпочати за 5 днів до прибуття в країну подорожі та застосовувати протягом усієї подорожі аж до дня прибуття з країни здійснення подорожі. Препарат слід застосовувати щоранку натщесерце. Максимальний термін застосування – 30 днів.

Побічні дії. Невідомо.

Протипоказання. Підвищена чутливість до будь-якого з компонентів лікарського засобу.

Застосування у період вагітності або годування груддю. Невідомо.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Невідомо.

Вплив на здатність управляти автотранспортом. Невідомо.

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 4-8 °С в недоступному для дітей місці.

Строк придатності. 1 рік.

Умови відпуску. Без рецепта.

Упаковка. По 5 флаконів об'ємом 1 мл в упаковці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hassan A., Din A. U., Zhu Y., Zhang K., Li T., Wang Y., et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, 103: 5993-6006. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09927-4>
2. Bhat B., Bajaj B. K. Hypocholesterolemic potential of probiotics: Concept and mechanistic insights. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2019, 57: 73-85.
3. Ishimwe N., Daliri E. B., Lee B. H., Fang F., Du G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Molecular nutrition & food research*. 2015, 59(1): 94-105. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400548>
4. Daliri E. B. M., Kim Y., Do Y., Chelliah R., Oh D. H. In vitro and in vivo cholesterol reducing ability and safety of probiotic candidates isolated from Korean fermented soya beans. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2022, 14(1): 87-98. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09798-0>
5. Choi E. A., Chang H. C. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-food Science and Technology*. 2015, 62(1): 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.019>
6. Huang Y., Wang X., Wang J., Wu F., Sui Y., Yang L., Wang Z. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*. 2013, 96(5): 2746-2753. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6123>
7. Tsai C. C., Lin P. P., Hsieh Y. M., Zhang Z. Y., Wu H. C., Huang C. C. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*. *The Scientific World Journal*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/690752>
8. Asan-Ozusaglam M., Gunyakti A. *Lactobacillus fermentum* strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects. *Food Science and Biotechnology*. 2019, 28: 501-509. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0494-y>

9. Palaniyandi S. A., Damodharan K., Suh J. W., Yang S. H. Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020, 12: 1161-1172. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09585-y>
10. Anandharaj M., Sivasankari B., Santhanakaruppu R., Manimaran M., Rani R. P., Sivakumar S. Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in microbiology*. 2015, 166(5): 428-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.002>
11. Zheng Y., Lu Y., Wang J., Yang L., Pan C., Huang Y. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PloS one*. 2013, 8(7): e69868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069868>
12. Anandharaj M., Sivasankari B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2014, 118(2): 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.015>
13. Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Huo G. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microbial biotechnology*. 2016, 9(6): 737-745. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12306>
14. Damodharan K., Lee Y. S., Palaniyandi S. A., Yang S. H., Suh J. W. Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. *Frontiers in microbiology*. 2015, 6: 768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00768>
15. Singh T. P., Malik R. K., Katkamwar S. G., Kaur G. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet. *International journal of food sciences and nutrition*. 2015, 66(1): 71-75. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.953450>

16. Yusuf D., Nuraida L., Dewanti-Hariyadi R., Hunaefi D. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Kefir Grains as Probiotics with Cholesterol-Lowering Effect. *J Microbiol Biotechnol.* 2020, 30(5): 726-732. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10028>
17. Kumar A., Kumar M., Ghosh M., Ganguli A. Modeling in vitro cholesterol reduction in relation to growth of probiotic *Lactobacillus casei*. *Microbiology and immunology.* 2013, 57(2): 100-110. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12008>
18. Park S., Kang J., Choi S., Park H., Hwang E., Kang Y., et al. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and its influence on the gut microbiome and propionate level in a murine model. *PLoS One.* 2018, 13(8): e0203150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203150>
19. Alaqil A. A., Abbas A. O., El-Beltagi H. S., El-Atty H. K. A., Mehaisen G. M., Moustafa E. S. Dietary supplementation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* modulates cholesterol levels, immune response, and productive performance of laying hens. *Animals.* 2020, 10(9): 1588. <https://doi.org/10.3390/ani10091588>
20. Damodharan K., Palaniyandi S. A., Yang S. H., Suh J. W. Functional Probiotic Characterization and In Vivo Cholesterol-Lowering Activity of *Lactobacillus helveticus* Isolated from Fermented Cow Milk S. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2016, 26(10): 1675-1686. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1603.03005>
21. Bendali F., Kerdouche K., Hamma-Faradji S., Drider D. In vitro and in vivo cholesterol lowering ability of *Lactobacillus pentosus* KF923750. *Beneficial Microbes.* 2017, 8(2): 271-280. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0121>
22. Singhal N., Maurya A. K., Mohanty S., Kumar M., Viridi J. S. Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. *Frontiers in microbiology.* 2019, 10: 1567. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01567>
23. Zhang F., Qiu L., Xu X., Liu Z., Zhan H., Tao X., et al. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants

on diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of dairy science*. 2017, 100(3): 1618-1628. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11870>

24. Ye H., Li Q., Zhang Z., Sun M., Zhao C., Zhang T. Effect of a novel potential probiotic *Lactobacillus paracasei* Jlus66 isolated from fermented milk on nonalcoholic fatty liver in rats. *Food & function*. 2017, 8(12): 4539-4546. <https://doi.org/10.1039/C7FO01108C>

25. Fhoula I., Rehaïem A., Najjari A., Usai D., Boudabous A., Sechi L. A., Hadda-Imene O. Functional probiotic assessment and in vivo cholesterol-lowering efficacy of *Weissella* sp. associated with arid lands living-hosts. *BioMed Research International*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1654151>

26. Ryan J. J., Hanes D. A., Schafer M. B., Mikolai J., Zwickey H. Effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* on cholesterol and lipoprotein particles in hypercholesterolemic adults: a single-arm, open-label pilot study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2015, 21(5): 288-293. <https://doi.org/10.1089%2Ffacm.2014.0063>

27. Saikia D., Manhar A. K., Deka B., Roy R., Gupta K., Namsa N. D., et al. Hypocholesterolemic activity of indigenous probiotic isolate *Saccharomyces cerevisiae* ARDMC1 in a rat model. *Journal of food and drug analysis*. 2018, 26(1): 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.017>

28. Bidura I. G. N. G., Siti N. W., Partama I. B. G. Effect of probiotics, *Saccharomyces* spp. Kb-5 and Kb-8, in diets on growth performance and cholesterol levels in ducks. *South African Journal of Animal Science*. 2019, 49(2): 219-226. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v49i2.2>

29. Aswani M. A., Kathade S. A., Anand P. K., Kunchiraman B. N., Dhumma P. R., Jagtap S. D. Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Saccharomyces cerevisiae* isolated from frass of *Pyrrharctia isabella* caterpillars. *Applied Food Biotechnology*. 2021, 8(3): 189-199. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v8i3.31729>

30. Aloğlu H. Ş., Özer E. D., Öner Z., Savaş H. B., Uz E. Investigation of a probiotic yeast as a cholesterol lowering agent on rats fed on a high cholesterol enriched

diet. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2015, 21 (5): 685-689.
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.13143>

31. Ogunremi O. R., Sanni A. I., Agrawal R. Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*. 2015, 17: 742-748.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.031>

32. Zullo B. A., Ciafardini G. Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their *in vitro* probiotic trait. *Food microbiology*. 2019, 78: 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.016>

33. Dey A., Ragavan M. L., Mandal S. K., Das N. Isolation, identification and *In vitro* characterisation of probiotic yeast strains. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2017, 10(3): 726-732. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00136.6>

34. Ragavan M. L., Das N. Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*. 2016, 69(5): 515-530.
<https://doi.org/10.1007/s13213-019-1440-9>

35. Tu C., Hu W., Tang S., Meng L., Huang Z., Xu X., et al. Isolation and identification of *Starmerella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation. *Food Science and Human Wellness*. 2020, 9(4): 355-362.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.010>

36. Majeed M., Majeed S., Nagabhushanam K., Arumugam S., Beede K., Ali F. Evaluation of the *in vitro* cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *International Journal of Food Science & Technology*. 2019, 54(1): 212-220. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13926>

37. Shobharani P., Halami P. M. *In vitro* evaluation of the cholesterol-reducing ability of a potential probiotic *Bacillus* spp. *Annals of Microbiology*. 2016, 66(2): 643-651. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1146-6>

38. Parveen R., Anandharaj M., Hema S., Deepika R., David Ravindran A. Purification of antilisterial peptide (Subtilisin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9

and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7: 1910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01910>

39. Shobharani P., Muthukumar S. P., Kizhakayil D., Halami P. M. Strain-specific quantification of native probiotic *Bacillus* spp. and their effect on liver function and gut microflora of experimental rats. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019, 11: 478-492. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9391-1>

40. Huang J., Xiao N., Sun Y., Wu S., Tian W., Lai Y., et al. Supplementation of *Bacillus* sp. DU-106 reduces hypercholesterolemia and ameliorates gut dysbiosis in high-fat diet rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021, 105: 287-299. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10977-2>

41. Ahmat M., Cheng J., Abbas Z., Cheng Q., Fan Z., Ahmad B., et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* lfb112 on growth performance, carcass traits, immune, and serum biochemical response in broiler chickens. *Antibiotics*. 2021, 10(11): 1427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111427>

42. Halder L., Gandhi D. N. Cholesterol-lowering effects of *Bacillus coagulans* B37 and *Bacillus pumilus* B9 strains in a rat animal model. *Indian Journal of Animal Research*. 2019, 53(4): 469-475. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3549>

43. Devyatkin V., Mishurov A., Kolodina E. Probiotic effect of *Bacillus subtilis* B-2998D, B-3057D, and *Bacillus licheniformis* B-2999D complex on sheep and lambs. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2021, 8(1): 146. <https://doi.org/10.5455%2Fjavar.2021.h497>

44. Kim B., Kwon J., Kim M. S., Park H., Ji Y., Holzapfel W., Hyun C. K. Protective effects of *Bacillus* probiotics against high-fat diet-induced metabolic disorders in mice. *PloS one*. 2018, 13(12): e0210120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210120>

45. Elbaz A. M., Ibrahim N. S., Shehata A. M., Mohamed N. G., Abdel-Moneim A. M. E. Impact of multi-strain probiotic, citric acid, garlic powder or their combinations on performance, ileal histomorphometry, microbial enumeration and

humoral immunity of broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production*. 2021, 53: 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02554-0>

46. Werdi C. M., Al-Hadidy Y. I. Effectiveness of *Bacillus clausii* and *Bacillus megaterium* on some Physiological and Biochemical Parameters in Rats That Induced Diarrhea. *IOP Publishing*. 2023, 1158(11): 112012. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1158/11/112012>

47. Nguyen T. P., Garrahan M. A., Nance S. A., Seeger C. E., Wong C. Assimilation of Cholesterol by *Monascus purpureus*. *Journal of Fungi*. 2020, 6(4): 352. <https://doi.org/10.3390/jof6040352>

48. Saleh A. A. Effect of dietary mixture of *Aspergillus* probiotic and selenium nano-particles on growth, nutrient digestibilities, selected blood parameters and muscle fatty acid profile in broiler chickens. *Anim Sci Pap Rep*. 2014, 32(1): 65-79.

49. Saleh A. A., Gálik B., Arpášová H., Capcarová M., Kalafová A., Šimko M., et al. Synergistic effect of feeding *Aspergillus awamori* and lactic acid bacteria on performance, egg traits, egg yolk cholesterol and fatty acid profile in laying hens. *Italian Journal of Animal Science*. 2017, 16(1): 132-139. <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2016.1269300>

50. Sugiharto S., Yudiarti T., Isroli I., Widiastuti E., Putra F. D. Effect of dietary supplementation with *Rhizopus oryzae* or *Chrysonilia crassa* on growth performance, blood profile, intestinal microbial population, and carcass traits in broilers exposed to heat stress. *Archives Animal Breeding*. 2017, 60(3): 347-356. <https://doi.org/10.5194/aab-60-347-2017>

51. Ragul K., Syiem I., Sundar K., Shetty P. H. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle. *Journal of food science and technology*. 2017, 54: 4473-4483. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2928-6>

52. Tom D. H., Schön C., Wagner T., Pankoke H. C., Fluegel M., Speckmann B. A synbiotic formulation comprising *Bacillus subtilis* DSM 32315 and L-alanyl-L-

glutamine improves intestinal butyrate levels and lipid metabolism in healthy humans. *Nutrients*. 2021, 14(1): 143. <https://doi.org/10.3390/nu14010143>

53. Rajput I. R., Li Y. L., Xu X., Huang Y., Zhi W. C., Yu D. Y., Li W. Supplementary effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on digestive enzyme activities, antioxidation capacity and blood homeostasis in broiler. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2013, 15(2): 1560-8530

54. Zhao H., Luo Y. E., Zhang Y., Chen X., Wang H., Guo D., Wu Z. Effects of *Bacillus subtilis* on hepatic lipid metabolism and oxidative stress response in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed a high-fat diet. *Marine Life Science & Technology*. 2020, 2: 50-59. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00005-2>

55. Shivangi S., Devi P. B., Ragul K., Shetty P. H. Probiotic potential of *Bacillus* strains isolated from an acidic fermented food Idli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020, 12: 1502-1513. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09650-x>

56. Mohamed T. M., Sun W., Bumbie G. Z., Dosoky W. M., Rao Z., Hu P., et al. Effect of Dietary Supplementation of *Bacillus subtilis* on Growth Performance, Organ Weight, Digestive Enzyme Activities, and Serum Biochemical Indices in Broiler. *Animals*. 2022, 12(12): 1558. <https://doi.org/10.3390/ani12121558>

57. O'Morain V. L., Ramji D. P. The potential of probiotics in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research*. 2020, 64(4): 1900797. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201900797>

58. Sivamaruthi B. S., Bharathi M., Kesika P., Suganthi N., Chaiyasut C. The administration of probiotics against hypercholesterolemia: A systematic review. *Applied Sciences*. 2021, 11(15): 6913. <https://doi.org/10.3390/app11156913>

59. Ramasamy K., Shafawi Z. M., Mani V., Wan H. Y., Majeed A. B. A. Hypocholesterolaemic effects of probiotics. *Complementary therapies for the contemporary healthcare*. 2021. <https://doi.org/10.5772/50785>

60. Silva A. R., Silva M. M., Ribeiro B. D. Plant-based milk products. In Future Foods Academic Press. 2022. P. 233-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00025-6>
61. Magno M. B., Nadelman P., de Abreu Brandi T. C., Pithon M. M., Fonseca-Gonçalves A., da Cruz A. G., Maia L. C. The effect of dairy probiotic beverages on oral health. In Milk-based beverages. Woodhead Publishing. 2019. P. 521-556. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00015-3>
62. Kang M. S., Lee D. S., Lee S. A., Kim M. S., Nam S. H. Effects of probiotic bacterium *Weissella cibaria* CMU on periodontal health and microbiota: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Oral Health*. 2020, 20: 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01231-2>
63. Han H. S., Yum H., Cho Y. D., Kim S. Improvement of halitosis by probiotic bacterium *Weissella cibaria* CMU: A randomized controlled trial. *Frontiers in Microbiology*. 2023, 14: 1108762. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1108762>
64. Yun H. S., Jang H. J., Lee N. K., Paik H. D. Evaluation of the probiotic characteristics and prophylactic potential of *Weissella cibaria* strains isolated from kimchi. *LWT*. 2019, 112: 108229. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.127>
65. Maślak E., Złoch M., Arendowski A., Sugajski M., Janczura I., Rudnicka J., et al. Isolation and identification of *Lactococcus lactis* and *Weissella cibaria* strains from fermented beetroot and an investigation of their properties as potential starter cultures and probiotics. *Foods*. 2022, 11(15): 2257. <https://doi.org/10.3390/foods11152257>
66. Fusco V., Quero G. M., Cho G. S., Kabisch J., Meske D., Neve H., et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology*. 2015, 6: 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
67. Dolan L. C., Arceneaux B. G., Do K. H., Lee W. K., Park G. Y., Kang M. S., Choi K. C. Toxicological and safety evaluations of *Weissella cibaria* strain CMU in animal toxicity and genotoxicity. *Toxicological Research*. 2022, 38(3): 293-310. <http://dx.doi.org/10.1007/s43188-021-00119-9>

68. Jang Y. J., Gwon H. M., Jeong W. S., Yeo S. H., Kim S. Y. Safety evaluation of *Weissella cibaria* JW15 by phenotypic and genotypic property analysis. *Microorganisms*. 2021, 9(12): 2450. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122450>
69. Jeon Y. B., Lee J. J., Chang H. C. Characterization of juice fermented with *Lactobacillus plantarum* EM and its cholesterol-lowering effects on rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Food Science & Nutrition*. 2019, 7(11): 3622-3634. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1217>
70. Solanki D., Hati S. Fermented camel milk: A Review on its bio-functional properties. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2018: 268-274. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i4.1661>
71. Probiotics Market. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alliedmarketresearch.com/probiotics-market#:~:text=The%20global%20probiotics%20market%20size,by%20maintaining%20intestinal%20microbial%20balance>.
72. Серцево-судинні захворювання — головна причина смерті українців. Висновки з дослідження глобального тягаря хвороб у 2019 році. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/sercevo-sudinni-zakhvoryuvannya-golovna-prichina-smerti-ukrainciv-visnovki-z-doslidzhennya>
73. Калініченко С. В., Бабич Є. М., Рижкова Т. А., Маслій І. Г., Коротких О. О., Даніліна С. С., та ін. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів. *Аннали Мечниковського інституту*. 2013, (3): 5-12.
74. Starovoitova S., Skrotska O. Technological aspects of probiotics obtaining. *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences*. 2014, 3 (21): 29 – 33.
75. Liquid Probiotics - All You Need To Know. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.optibacprobiotics.com/learning-lab/in-depth/general-health/liquid-probiotics>

76. Discover the Benefits of Liquid Probiotics. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.allohealth.care/healthfeed/nutraceuticals/liquid-probiotics>

77. Пробиотики форма товару суспензія або флакон або краплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.add.ua/ua/vitaminy-i-bady/vitamini-i-dobavki/preparati-dlya-uluchsheniya-mikroflori/probiotiki/l/forma-tovara:suspenzija-kapli-flakon/>

78. Рідкі пробиотики. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://apteka911.ua/ua/shop/lekarstvennyie-preparaty/kapli_8258,suspenziya-ampula_1,flakon_1-probiotiki

79. Ентерожерміна форте суспензія ор. по 5 мл №10 у флак. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5/33798/>

80. Флороспорін суспензія пероральна рідкий пробіотик для регулювання мікрофлори кишечника в флаконах по 5 мл 10 шт. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/florospirin-suspenziya-peroralna-ridkiy-probiotik-dlya-regulyuvannya-mikroflori-kishechnika-v-flakonah-po-5-ml-10-sht-p132085>

81. Євро-Біотик суспензія 5 мл флакон №10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.add.ua/ua/evro-biotik-suspenzija-5-ml-flakon-10.html>

82. Пробиель (PROBIELLE) Джуніор пробіотик для дітей суспензія у флаконах по 7 мл, 10 шт. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://podorozhnyk.com/probiel-dzhunior-susp-fl-7ml-10/>

83. Мутафлор суспензія оральна в ампулах поліетиленових по 1 мл 5 шт. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/mutaflor-susp-oral-amp-1ml-5-p63061>

84. Технология Blow-fill-seal. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pharmsolution.org/ru/blow-fill-seal-ru/>

85. OEM Sterile Packaging 5ml Plastic Ampoule. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/OEM-Sterile-Packaging-Face-Serum-5ml_1600788824979.html?spm=a2700.7724857.0.0.7a5e496aL1Dmac&s=p
86. Sacha G. A., Saffell-Clemmer W., Abram K., Akers M. J. Practical fundamentals of glass, rubber, and plastic sterile packaging systems. *Pharmaceutical development and technology*. 2010, 15(1): 6-34. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450903511178>
87. High Quality Ethylene Vinyl Acetate Copolymer EVA Resin Foaming Granule Price. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Ethylene-Vinyl-Acetate-Copolymer_1600789872492.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.1.3b7a3905K3HObI
88. Evasin полимера/EVOH EVOH гранулы/этилен винил спирт сополимера CAS: 26221-27-5. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ru.made-in-china.com/co_hbzy-566/product_Evasin-EVOH-Resin-EVOH-Granules-Ethylene-Vinyl-Alcohol-Copolymer-CAS-26221-27-5_ysneuiuhog.html
89. Поліетилен низького тиску (ВП). Гранула. Мішки по 25кг. Відправка по Україні. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p56533583-polietilen-nizkogo-davleniya.html?&primelead=M14zNQ>
90. Tousehik S. H., Kim K., Ashrafudoulla M., Mizan M. F. R., Roy P. K., Nahar S., et al. Korean kimchi-derived lactic acid bacteria inhibit foodborne pathogenic biofilm growth on seafood and food processing surface materials. *Food Control*. 2021, 129: 108276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108276>
91. Automatic Plastic Ampoule Filling Sealing Machine SED-SP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sedpharma.com/product/automatic-plastic-ampoule-sealing-machine-for-oral-liquid/>

92. Blow-Fill-Seal (BFS) Improving Uptime in Aseptic Liquid Processing. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.tofflon.com/en/news-detail.html?news=13702>

93. ВТОРИННА УПАКОВКА ТАБЛЕТОК – ОПИС І ОСОБЛИВОСТІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://balenko.com/vtorynna-upakovka-tabletok-opys-i-osoblyvosti/>

94. “Видавничий дім “Укрпол”. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrpol.ua/>

95. ТОВ "Modern Pak". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.modernpak.com.ua/>

96. «Тріада-М». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://triada-m.com/>

97. «Vesna». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vesnaph.com/#first>

98. «UBI PACK STUDIO». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ubi-pack.com/>

99. Oh A., Daliri E. B. M., Oh D. H. Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: *In vitro* and *Caenorhabditis elegans* model testing. *LWT*. 2018, 88: 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.007>

100. Huang C. H., Ho C. Y., Chen C. T., Hsu H. F., Lin Y. H. Probiotic BSH activity and anti-obesity potential of *Lactobacillus plantarum* strain TCI378 isolated from Korean Kimchi. *Preventive nutrition and food science*. 2019, 24(4): 434. <https://doi.org/10.3746%2Fpnf.2019.24.4.434>

101. Le B., Yang S. H. Effect of potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* FB111 in prevention of cholesterol absorption by modulating NPC1L1/PPAR α /SREBP-2 pathways in epithelial Caco-2 cells. *International Microbiology*. 2019, 22: 279-287. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00047-z>

102. Ismail A., Yaacob I. H., Yasin I. M. M. Cholesterol assimilation of *Lactobacillus plantarum* L8 and *Lactobacillus pentosus* S1 through in-vitro cholesterol

lowering activity. *Journal of Academia*. 2022, 10(2): 158-168.

<https://myjms.mohe.gov.my/index.php/joa/article/view/19839>

103. Muryany I., Lian H. H., Ina-Salwany A. R. G., Ghazali A. R., Zamri-Saad M., Rajab N. F. Adhesion ability and cytotoxic evaluation of *Lactobacillus* strains isolated from Malaysian fermented fish (pekasam) on Ht-29 and Ccd-18Co intestinal cells. *Sains Malays*. 2018, 47: 2391-2399. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4710-15>

104. Yang L., Xie X., Li Y., Wu L., Fan C., Liang T., et al. Evaluation of the cholesterol-lowering mechanism of *Enterococcus faecium* strain 132 and *Lactobacillus paracasei* strain 201 in hypercholesterolemia rats. *Nutrients*. 2021, 13(6): 1982. <https://doi.org/10.3390/nu13061982>

105. Aswani M. A., Kathade S. A., Anand P. K., Kunchiraman B. N., Dhumma P. R., Jagtap S. D. Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Saccharomyces cerevisiae* isolated from frass of *Pyrrharctia isabella* caterpillars. *Applied Food Biotechnology*. 2021, 8(3): 189-199. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v8i3.31729>

106. Björkegren J. L., Lüscher A. J. Atherosclerosis: recent developments. *Cell*. 2022, 185(10): 1630-1645 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>

107. Атеросклероз в Україні: вмираємо жартуючи. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://life.pravda.com.ua/health/2013/04/3/125667/>

108. Атеросклероз судин. Як себе вберегти. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://evroklinika.com/porady-likariv/terapevt-vu/ateroskleroz-sudin-yak-sebe-vberegti/>

109. Статистика смертності від атеросклерозу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.meddiagnostica.com.ua/uk/publ-kats/statistika-smertnosti-vid-aterosklerozu/>

110. Принципи медикаментозного лікування атеросклерозу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rpht.com.ua/ua/archive/2010/2%2815%29/pages-37-40/principi-medikamentoznogo-likuvannya-aterosklerozu>

111. Thushara R. M., Gangadaran S., Solati Z., Moghadasian M. H. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & function*. 2016, 7(2): 632-642. <https://doi.org/10.1039/C5FO01190F>
112. Di Cerbo A., Palmieri B. The market of probiotics. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2015, 28(6): 2199-2206
113. Mahdavi-Roshan M., Salari A., Kheirkhah J., Ghorbani Z. The effects of probiotics on inflammation, endothelial dysfunction, and atherosclerosis progression: a mechanistic overview. *Heart, Lung and Circulation*. 2022, 31(5): e45-e71 <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2021.09.006>
114. За даними Фонду народонаселення ООН, в Україні станом на 2023 рік проживає 36,7 мільйона людей. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrinform.ua/rubric-society/3698384-v-ukraini-prozivaut-ponad-36-miljoniv-ludej-onn.html>
115. Wang G., Chen Y., Xia Y., Song X., Ai L. Characteristics of probiotic preparations and their applications. *Foods*. 2022, 11(16): 2472. <https://doi.org/10.3390/foods11162472>
116. НЕПЕРЕНОСИМІСТЬ ДРІЖДЖІВ ТА АЛЕРГІЯ НА ДРІЖДЖІ - ЩО РОБИТИ? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uan.koshachek.com/articles/neperenosimist-drizhdzhiv-drizhdzhova-alergija.html>
117. Вчимося читати етикетку: емульгатори, консерванти, стабілізатори. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sz.lviv.ua/slider/20180607_1438/
118. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
119. Huy N. D., Ngoc L. M. T., Loc N. H., Lan T. T., Quang H. T., Dung T. Isolation of *Weissella cibaria* from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gastrointestinal tract and evaluation of its pathogenic bacterial inhibition. *Indian Journal of Science & Technology*. 2020, 13(10): 1200-1212. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2020/v13i10/149934>

120. Yao D., Wang X., Ma L., Wu M., Xu L., Yu Q., et al. Impact of *Weissella cibaria* BYL4. 2 and its supernatants on *Penicillium chrysogenum* metabolism. *Frontiers in Microbiology*. 2022, 13: 983613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983613>
121. Shayestehpour M., Rahimi M. R., Piroozmand A., Khaledi A., Fateminasab Z. S. *In Vitro* Evaluation of Antiviral Activity Effect of Selenium, *Bacillus clausii* Supernatant, and Their Combination on the Replication of Herpes Simplex Virus 1. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2022, 15(8). <https://doi.org/10.5812/jjm-129848>
122. Abelha P., Janssen A., Vilela C. M., Nanou P., Carbo M. Low-grade biomass upgrading by washing and torrefaction: lab and pilot-scale results. In 26th European Biomass Conference and Exhibition. 2018. P. 1209-1220. <http://dx.doi.org/10.5071/26thEUBCE2018-3DV.6.3>
123. Лактімак. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://podorozhnyk.com/laktimak-susp-fl-5ml-10/>
124. Диоксид кремнія. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://chemsale.com.ua/product/kremnij-dioksid/>
125. Натрію гідрокарбонат. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1191/natriyu-gidrokarbonat>
126. Стеарат магнію. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://azovsintez.ua/magnesium-stearate>
127. Gujvinska S. O., Paliy A. P., Dunaeva O. V., Berezhna N. V. Biotechnology production of medium for cultivation and lyophilization of lactic acid bacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018, 8(2): 5-11.
128. Kang M. S., Kim Y. S., Lee H. C., Lim H. S., Oh J. S. Comparison of temperature and additives affecting the stability of the probiotic *Weissella cibaria*. *Chonnam medical journal*. 2012, 48(3): 159-163. <http://dx.doi.org/10.4068/cmj.2012.48.3.159>

129. Аптечна технологія ліків. Модуль 2. Методичний посібник для викладачів. Змістовий модуль 2.2: Лікарські засоби, що потребують асептичних умов виготовлення. 3.: ЗДМУ. – 2014. – с. 166.

130. МАНІТОЛ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=23561#:~:text=%D0%94%D1%96%D1%82%D1%8F%D0%BC%20%D1%8F%D0%BA%20%D0%B4%D1%96%D1%83%D1%80%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%20%D0%B2%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%8F%D1%82%D1%8C%2015,%D0%BD%D0%B0%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%82%D1%8F%D0%B3%D0%BE%D0%BC%2030%20%2D%2060%20%D1%85%D0%B2>.

131. Use of a Platform Formulation Technology to De-Risk Solid-State Variation in Drug Development. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/421/302/parteckslc-wp11987en-mk.pdf>

132. Erten H. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochemistry*. 1998, 33(7): 735-739. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00041-7)

133. CFU Full Form. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unacademy.com/content/neet-ug/full-forms/cfu/>

134. Fusco V., Quero G. M., Cho G. S., Kabisch J., Meske D., Neve H., et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology*. 2015, 6: 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>

135. Subsanguan T., Khondee N., Nawavimarn P., Rongsayamanont W., Chen C. Y., Luepromchai E. Reuse of immobilized *Weissella cibaria* PN3 for long-term production of both extracellular and cell-bound glycolipid biosurfactants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8: 751. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00751>

136. Hashium A. J., Hamza S. J., Aldujaili N. H. Antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Weissella cibaria* NRIC0136. *Al-Kufa University Journal for Biology*. 2010: 2(1).

137. Huy N. D., Ngoc L. M. T., Loc N. H., Lan T. T., Quang H. T., Dung T. Isolation of *Weissella cibaria* from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gastrointestinal tract and evaluation of its pathogenic bacterial inhibition. *Indian Journal of Science & Technology*. 2020, 13(10): 1200-1212. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2020/v13i10/149934>

138. Yao D., Wang X., Ma L., Wu M., Xu L., Yu Q., et al. Impact of *Weissella cibaria* BYL4. 2 and its supernatants on *Penicillium chrysogenum* metabolism. *Frontiers in Microbiology*. 2022, 13: 983613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983613>

139. Daliri E. B. M., Kim Y., Do Y., Chelliah R., Oh D. H. In vitro and in vivo cholesterol reducing ability and safety of probiotic candidates isolated from Korean fermented soya beans. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2022, 14(1): 87-98. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09798-0>

140. Технологія пробіотиків та вакцин [Електронний ресурс]: Лабор. практ. для студ. освітнього рівня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія» денної форми навч. / Уклад.: Ю.М. Пенчук, Т.Л. Сулейко Т.М. Нечипор – К: НУХТ, 2018. – 36 с.

141. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005.

142. ДЕЗІНФЕКЦІЯ. МЕТОДИ ДЕЗІНФЕКЦІЇ ► ФІЗИЧНИЙ, ХІМІЧНИЙ, КОМБІНОВАНИЙ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/press/metody-dezinfektsii-fizicheskiy-khimicheskiy-kombinirovanny.html>

143. Сучасні дезінфекційні засоби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.oblses.ck.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=1466:2018-09-19-09-46-41&catid=41:2013-05-13-02-14-47&Itemid=57

144. Ласепт-макс, 100 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biosanimal.com.ua/uk/p/1459429630-lasept-maks-100-ml/>

145. Ласепт ® Макс. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lasept.com.ua/ru/dezinficiruyushchie-sredstva-dlya-primeneniya-v-veterinarii/lasept-r-maks>

146. Деканаль. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://antiseptika.prom.ua/ua/p807818-dezsredstvo-dekanal-dlya.html>

147. Средство дезинфицирующее для поверхностей DEZALDUM 20 5л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ru.atma.ua/professionalnaya-himiya/dezinfektsiya/sredstvo-dezinfitsiruyushhee-dlya-kozhi-ruk-dezaldum-20-5l-da015000/>

148. ЗАСІБ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИЙ ВЕРНЕДОР-ОКСІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mdmgroup.com.ua/zasoby-dlya-dezinfekciyi-poverhon-ta-obladnennya/zasib-dezinfekcijnyj-vernedor#38002>

149. ВЕРНЕДОР-ОКСІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/i-n-s-t-r-u-k-ts-i-ia-shchodo-zastosuvannia-zasobu-dezinfektsiinoho-vernedor-z-metoiu-dezinfektsii-dosterylizatsiinoho-ochyshchennia-ta-sterylizatsii/>

150. Засіб дезінфікуючий "Періцид-НАТА (Pericide - NATA)". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://natagroup.com.ua/%D0%9F%D0%B5%D1%80%D1%96%D1%86%D0%B8%D0%B4%20%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B9%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D1%96%D0%BA%D1%83%D1%8E%D1%87%D0%B8%D0%B9%20%D0%B7%D0%B0%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%BD%D0%B0%20%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D1%96>

[%20%D0%BF%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4%D1%83%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D1%8E](#)

151. Періцид-НАТА каністра. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medshop.com.ua/ua/sterilizaciya-dezinfekciya/sredstva-dlya-dezinfektsii/pericide-nata-5-litr.html>

152. ДЕЗИНФЕКТАНТ БЛАНИДАС-А ОКСИ 35, 30Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.5sec-pro.com.ua/ru/blandas-a-oks-35-30l-35kg.html>

153. PBM Series BFS Machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.shinvaglobal.com/01-pbm-series-bfs-machine-product/>

154. ASEP-TECH® Blow/Fill/Seal Systems Data. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.weilerengineering.com/images/downloads/Datasheets/Weiler-Model-640.pdf>

155. AFP Aseptic Blow Fill Seal For Plastic Container Parenterals. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.spm.so/product/bfs-plastic-ampoule-production-line/>

156. Automated Visual Inspection Machine/High Quality Light Inspection Machine for Vial, Syrup and Ampoule Bottles. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ivenpharmatech.en.made-in-china.com/product/NnHUCAeuEvVy/China-Automated-Visual-Inspection-Machine-High-Quality-Light-Inspection-Machine-for-Vial-Syrup-and-Ampoule-Bottles.html>

157. Диагностическая машина для наполнения пластиковых флаконов. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/diagnostics-plastic-vial-filling-machine_1600294563602.html?spm=a2700.7724857.0.0.2e5e4dcbkeQo9U

158. INSPECTION FOR PLASTIC CONTAINER LT-S. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.marchesini.com/en/machines-lines/lt-s>

159. SML-690 BFS labeling machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.sunandmoonsh.com/SML-690-BFS-labeling-machine-pd46521264.html>
160. Automatic Vial Sticker Labeling Machine For Pharmaceutical. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.z-zonepharmachine.com/sale-37313725-automatic-vial-sticker-labeling-machine-for-pharmaceutical-chemical.html>
161. ZONESUN ZS-TB823. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Plastic-Bottles-Labeling-Machine-ZONESUN-ZS_62075878027.html?s=p
162. CD-30 Horizontal End Load Cartoners. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.chengdamachinery.com/product/cd-30-horizontal-end-load-cartoners>
163. MA300 – 400. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.marchesini.com/en/machines-lines/ma300-400>
164. Cartoner C 2155. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bickelwolf.cz/files/lieferanten/UHLMANN/documents/engl-cartonerc2155.pdf>
165. The CP/TP and CP/WA. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.formeca.fi/ryhmaepakkaus koneet-1?lang=en>
166. Automatic packaging machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.medicalexpo.com/prod/ilpra/product-129227-1089475.html>
167. Automatic packaging machine RDM-SD. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.medicalexpo.com/prod/jr-maruani-packaging-machine/product-4578083-1116607.html>
168. Lim H. S., Yeu J. E., Hong S. P., Kang M. S. Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules*. 2018, 23(8): 1984. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules23081984>
169. Державна фармакопея України. Доповнення 2. — Х., 2008.
170. Lactic Agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M599.pdf

171. Raka-Ray Agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sial/02538>
172. BD LBS Agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/pa/pa-255011.pdf>
173. Fusco V., Quero G. M., Cho G. S., Kabisch J., Meske D., Neve H., et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology*. 2015, 6: 155. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2015.00155>
174. Maślak E., Złoch M., Arendowski A., Sugajski M., Janczura I., Rudnicka J., et al. Isolation and identification of *Lactococcus lactis* and *Weissella cibaria* strains from fermented beetroot and an investigation of their properties as potential starter cultures and probiotics. *Foods*. 2022, 11(15): 2257. <https://doi.org/10.3390%2Ffoods11152257>
175. АТС-класифікація. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/atc/>