

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра біотехнології та хімії

До захисту допускається

Зав. кафедрою, доцент

Владислав КОВАЛЕНКО

" ____ " _____ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за першим (бакалаврським) рівнем вищої освіти

на тему: «Поліпшення складу льодяників з пробіотиком»

ВИКОНАВЕЦЬ:

студентка 5 курсу спеціальність 162 -

Біотехнології та біоінженерія

Яна БУЛКА

КЕРІВНИК:

к. с.-г. н., доцент

Володимир ДУБОВИК

СУМИ -2025

Сумський національний аграрний університет

Кафедра біотехнології та хімії

Ступінь вищої освіти – бакалавр

Галузь знань: 16 – Хімічна та біоінженерія

Спеціальність: 162 – біотехнології та біоінженерія

Освітньо–професійна програма – Біотехнологія та біоінженерія

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Завідувач кафедри

Владислав КОВАЛЕНКО

«_____» _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ**

Студентці **Булці Яні Олегівні**

Тема роботи: **Поліпшення складу льодяників з пробіотиком**

1. Керівник бакалаврської роботи **Дубовик Володимир Іванович, к. с.-г. н., доцент**

2. Строк подання студенткою кваліфікаційної роботи _____

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи – _____

4. Зміст кваліфікаційної роботи _____

5. Перелік графічного матеріалу _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № п/п | Назви етапів кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітки |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------|
| 1. | Вибір теми і об'єкта досліджень | 5-й семестр | |
| 2. | Розробка завдання до кваліфікаційної роботи; складання календарного плану; формування змісту розрахунково-пояснювальної записки (формування переліку питань, які необхідно опрацювати в роботі). Підбір методик для проведення досліджень | 5-й семестр | |
| 3. | Виконання кваліфікаційної роботи | | |
| 3.1. | Підбір та аналіз літературних джерел з теми кваліфікаційної роботи | 5-й семестр | |
| 3.2. | Збір вихідних даних (проведення польових досліджень) для написання експериментальної частини кваліфікаційної роботи | 6-й семестр | |
| 3.3. | Підготовка загального варіанту кваліфікаційної роботи (розділ 1-3, висновки) | 7-й семестр | |
| 3.4. | Апробація результатів дослідження | За 40 днів до дати захисту | |
| 4. | Перевірка роботи науковим керівником і допуск до попереднього захисту | За 35 днів до дати захисту | |
| 5. | Перевірка кваліфікаційної роботи на унікальність | За 30 днів до захисту | |
| 6. | Рецензування | За 15 днів до захисту | |
| 7. | Попередній захист кваліфікаційної роботи | За 10 днів до захисту | |
| 8. | Прилюдний захист кваліфікаційної роботи перед екзаменаційною комісією | Відповідно наказу ректора | |

Керівник кваліфікаційної роботи _____ /

підпис

Здобувач _____ /

підпис

АНОТАЦІЯ

Булка Яна Олегівна

ПОЛПШЕННЯ СКЛАДУ ЛЬОДЯНИКІВ З ПРОБІОТИКОМ

162 Біотехнології та біоінженерія

СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Суми – 2025

Оральні пробіотичні препарати у вигляді льодяників двох складів із живих молочнокислих бактерій і метаболітів цих бактерій, вироблені за обраними методиками, показали високі гістологічні властивості та ефективність, виживання бактерій та антибактеріальні властивості. У ході серії теоретичних, мікробіологічних і технічних досліджень були розроблені препарати для слизової оболонки порожнини рота, що містять пробіотики двох складів у формі льодяників (з культур пробіотиків і їх метаболітів), які можуть бути рекомендовані як дієтичний продукт після проведення досліджень і визначення безпечності для мікрофлори порожнини рота. Може бути рекомендований як дієтична добавка, що підтримує та стимулює власний імунітет, а також при інфекціях оральної порожнини та захворюваннях шлунково-кишкового тракту як лікувально-профілактичний засіб.

Робота має таку структуру: вступ, три розділи, висновки та пропозиції. Загальний обсяг – 42 сторінки, з них 33 сторінки відведені під основні розділи. В роботі наведено 10 рисунків та 5 таблиць, використано 38 джерел літератури.

Ключові слова: галітоз, ксиліт, лактобактерії, льодяники, пробіотики, сорбіт.

ABSTRACT
Bulka Yana Olegivna
IMPROVING THE COMPOSITION OF LOLLIPOPS WITH
PROBIOTICS

162 Biotechnology and bioengineering
SUMY NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY
Sumy - 2025

Oral probiotic preparations in the form of lozenges of two compositions from live lactic acid bacteria and metabolites of these bacteria, produced by the selected methods, showed high histological properties and efficiency, bacterial survival and antibacterial properties. In the course of a series of theoretical, microbiological and technical studies, preparations for the oral mucosa containing probiotics of two compositions in the form of lozenges (from probiotic cultures and their metabolites) were developed, which can be recommended as a dietary product after conducting studies and determining safety for the oral microflora. It can be recommended as a dietary supplement that supports and stimulates one's own immunity, as well as for oral infections and diseases of the gastrointestinal tract as a therapeutic and prophylactic agent.

The work has the following structure: introduction, three sections, conclusions and proposals. The total volume is 42 pages, of which 33 pages are devoted to the main sections. The work contains 10 figures and 5 tables, and 38 sources of literature are used.

Keywords: halitosis, xylitol, lactobacilli, lollipops, probiotics, sorbitol.

ЗМІСТ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВСТУП | 6 |
| РОЗДІЛ 1. МІКРООРГАНІЗМИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ БОРОТЬБИ З НИМИ (Огляд літератури) | 9 |
| 1.1. Характеристика мікробіому ротової порожнини | 9 |
| 1.2. Характеристика засобів для профілактики та лікування ЛОР-захворювань | 11 |
| 1.3. Характеристика льодяників, як потенційної форми для лікування ЛОР-захворювань | 14 |
| 1.4. Проблема карієсогенності | 18 |
| РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | 23 |
| 2.1. Обґрунтування підбору компонентів складу льодяників з пробіотичною активністю | 23 |
| 2.2. Об'єкти досліджень | 25 |
| 2.3. Методи досліджень | 29 |
| РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ ПРОБІОТИКІВ У СКЛАДІ ЛЬОДЯНИКІВ | 32 |
| 3.1. Вивчення можливості використання пробіотичних культур сумісно з іншими компонентами | 32 |
| 3.3. Відпрацювання технології виробництва льодяників з пробіотиками | 37 |
| 3.4. Визначення ефективності льодяників | 39 |
| ВИСНОВКИ | 41 |
| ПРОПОЗИЦІЇ | 42 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 43 |

ВСТУП

Актуальність роботи. На ринку сьогодні з'явилося багато продуктів, які містять пробіотики (живі бактерії, що мають користь для здоров'я). Пробиотики традиційно асоціюються зі здоров'ям кишечника, але найбільший інтерес до них зосереджений на лікуванні та профілактиці шлунково-кишкових захворювань та інфекцій. Однак за останні кілька десятиліть відомі та прогнозовані переваги пробіотичних бактерій для здоров'я зросли. Вони включають посилення адаптивних імунних реакцій, лікування та профілактику інфекцій сечовивідних шляхів і респіраторних захворювань, а також запобігання та полегшення алергічних і atopічних захворювань. Також крім того, з усвідомленням того, що більшість захворювань прямо (наприклад, кандидоз, карієс, пародонтоз) або опосередковано (наприклад, серцево-судинні та в деяких випадках ожиріння) пов'язані з дисбалансом мікробіому порожнини рота, дослідження пробіотиків рухаються в новому напрямку: продукти, які можуть відновлювати або підтримувати здоров'я.

Тому мікробіота порожнини рота в даний час інтенсивно вивчається, і створили базу даних, що містить інформацію про мікроорганізми, присутні в порожнині рота. Найпоширенішим з них є рід *Streptococcus*, тоді як *Haemophilus* spp. зустрічаються в слизовій оболонці щік, *Actinomycetes* - в супрагінгівальній дентальній бляшці, *Prevotella* spp. в субгінгівальній бляшці, а традиційні молочнокислі бактерії *Lactobacillus* spp. є переважно транзитною мікрофлорою.

Що стосується мікробіоти порожнини рота, слід звернути увагу на тісний симбіотичний зв'язок між мікро- і макробіотою мікробіома. Це пов'язано з тим, що представники нормального мікробіому конкурентно витісняють або запобігають утворенню колоній патогенної мікрофлори на слизовій оболонці.

Підтримка та стимуляція мікрофлори ротової порожнини це ефективний фактор пригнічення розвитку патогенних мікроорганізмів, особливо тих, що викликають отоларингологічні захворювання та неприємний запах з рота. Тому

спектр терапевтичних засобів для лікування отоларингологічних захворювань і неприємного запаху з рота може бути розширений за рахунок розробки пероральних препаратів на основі пробіотиків.

Метою роботи було вдосконалення складу раніше розробленого пробіотичного льодяника, введення інгредієнта для лікування неприємного запаху з рота та розробка технологій виробництва.

Для досягнення мети були виконані наступні роботи:

1. обговорюються теоретичні питання, пов'язані з використанням пробіотичних культур у лікуванні інфекційно-запальних захворювань, особливо ротової порожнини;
2. характеристика засобів лікування та профілактики отоларингологічних захворювань і галітозу;
3. обґрунтування вибору пробіотичних діючих компонентів;
4. визначити допоміжні та основні компоненти льодяників;
5. визначення сумісного використання компонентів, які були обрані із допоміжними та основними речовинами льодяника;
6. розробити технологію виробництва льодяників двох складів (на живих пробіотичних культурах та їх метаболітах);
7. визначити ефективність для двох складів препарату.

Об'єктами дослідження був льодяник двох складів на основі ксиліту та сорбіту – живі пробіотичні культури та метаболіти.

Методи дослідження. Використані класичні мікробіологічні та технічні методи виробництва льодяників. Для перевірки ефективності зразків були обрані наступні методи: визначення життєздатної кількості молочнокислих бактерій методом Коха (посів у чашки) у дослідженнях сумісного застосування з компонентами лікарських засобів та у готових пероральних пробіотиках, а також метод дифузії на агар для визначення зон затримки росту мікроорганізмів у досліджуваних штамів.

Практична значимість роботи. Дослідження властивостей *L. plantarum* 8P-A3 та *L. fermentum* 90-TC показало їх потенціал для використання у

пероральних пробіотичних продуктах. Також запропоновано використання метаболітів цих штамів та рослинних компонентів з достатньо високою антимікробною активністю щодо умовно-патогенних мікроорганізмів, які викликають інфекційні отоларингологічні захворювання та неприємний запах з рота. Пероральні пробіотичні препарати льодяники, що виготовлені з живими молочнокислими бактеріями і їх метаболітами, показали високу антимікробну активність, ефективність і бактеріальну життєздатність.

Два пробіотичні льодяники, також відомі як пробіотичні культури та метаболіти, були створені в результаті великої кількості технічних, теоретичних і біотехнологічних досліджень. Поточні дослідження показали, що льодяники, які підтримують мікрофлору у ротовій порожнині та підвищують імунну систему організму, можуть бути рекомендовані як профілактичний засіб для лікування галітозу та інфекцій порожнини рота.

Структура та обсяг роботи. Представлена робота складається з 3 основних розділів, зміст яких відповідає темі кваліфікаційної роботи. Загальний обсяг – 42 сторінки, з них 33 сторінки відведені під основні розділи. В роботі наведено 10 рисунків та 5 таблиць, використано 38 джерел літератури.

РОЗДІЛ 1

МІКРООРГАНІЗМИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ БОРОТЬБИ З НИМИ (Огляд літератури)

1.1 Характеристика мікробіому ротової порожнини

На слизовій оболонці та шкірі завжди присутні різні мікроорганізми, більшість яких у симбіотичних відносинах з макроорганізмами та не провокують патологічні зміни у колонізованих структурах. Їх сукупність становить нормальну мікрофлору.

Кількісні та якісні зміни цієї мікрофлори (дисбіоз) спричиняють патологічні стани. Представники нормальної мікрофлори конкурентно витісняють або перешкоджають утворенню слизових колоній патогенної мікрофлори, що є одним з найважливіших механізмів неспецифічного місцевого імунітету.

Представники нормальної мікрофлори вже понад 100 років використовуються для розробки продуктів з пробіотичними властивостями. Найбільшого поширення набули бактерії роду *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* [4].

На сьогоднішній день зібрана інформація про близько 700 родів мікроорганізмів ротової порожнини [6]. Як уже згадувалося, найпоширенішими представниками є бактерії родів *Streptococcus*, *Haemophilus* і *Prevotella*, а традиційні пробіотичні штами *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* зустрічаються значно рідше [5, 6].

У ротовій порожнині лактобактерії зазвичай становлять менше 1% від загальної мікрофлори. Деякі види виявляються як у зразках ротової порожнини, так і у фекаліях [7, 8]. Найчастіше зі зразків слини виділяють *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* та *L. salivarius*.

Біфідобактерії є одними з перших анаеробних бактерій у ротовій порожнині [9]. Насправді, і лактобактерії, і біфідобактерії виявляються в

грудному молоці, що пояснює ранню колонізацію порожнини рота цими бактеріями.

Біфідобактерії, виділені зі зразків ротової порожнини, - це *B. bifidum*, *B. dentium* та *B. longum* [10, 11].

Найбільш логічна стратегія при розробці пробіотичних препаратів це використання штамів, які виділені з їх природного середовища існування. *Salivarius*, зокрема, є бактерією, яка вперше оселилася в ротовій порожнині людини і залишається протягом життя там як представник нормальної мікробіоти рота [12, 13]. Однак, не варто забувати і про традиційні лактобактерії та біфідобактерії, які не є постійними в ротовій порожнині, але вони мають велике значення для стимуляції імунної системи.

Три основні групи механізмів дії пробіотиків: регулювання мікробіоти кишечника, метаболічна дія та регулювання імунної відповіді [2]. Дія пробіотиків у порожнині рота може бути схожа на те, що відбувається в кишечнику. Механізми дії пробіотиків у ротовій порожнині можуть бути подібними до тих, що описані для кишечника. Однак, хоча загальна кількість в слині секреторного IgA, схоже, не змінюється під впливом пробіотиків, не треба виключати можливість системного ефекту [14].

Існуючі дослідження показують, що споживання біфідобактерій або пробіотичних лактобактерій зменшує кількість у слині карієсогенних стрептококів, особливо *Streptococcus mutans* [15- 17].

Перше дослідження з використанням пробіотиків для покращення здоров'я ротової порожнини було проведено для лікування пародонту [18]. Захворювання пародонту, гінгівітом та пародонтозом отримали місцеве лікування штаму *L. Acidophilus* супернатантом. В результаті майже у всіх пацієнтів спостерігалось значне поліпшення стану. В останні роки є значний інтерес у використанні для лікування пародонту пробіотиків.

У цих дослідженнях використовували штами пробіотиків *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. salivarius* WB21, *L. casei* Shirota та *Bacillus subtilis*, їх ефективність оцінювали за зменшенням кровоточивості ясен [19, 20]. Використання

пробіотичних жувальних гумок, що містять *L. reuteri* ATCC PTA 5289 і ATCC 55730, знижувало також рівень запальних цитокінів [21], а *L. brevis* зменшували активність колагенази [22]; використання *L. salivarius* WB21, зменшували глибину ясенних кишень, особливо в групах ризику як курці, та впливало на кількість пародонтопатогенних мікроорганізмів у слинному нальоті [23].

Подібні дослідження підтвердили вплив складу мікробіоти порожнини рота на здоров'я та його можливу корекцію за допомогою пробіотичних штамів лактобактерій та біфідобактерій.

1.2 Характеристика засобів для профілактики та лікування ЛОР-захворювань

Захворювання вуха, горла та носа поширені в усіх вікових групах, але найвищий рівень захворюваності спостерігається в дитячій популяції. Це можна пояснити морфологічною незрілістю органів ротоглотки та віковою незрілістю імунної системи. Захворювання вуха, горла та носа в дитячому віці пов'язані з найбільшими ускладненнями і потребують діагностики та лікування в ранньому віці [24]. При лікуванні ЛОР-захворювань застосовуються засоби і методики, які дозволяють уберегти від негативних емоцій дитину. Крім того, застосування засобів лікування у дітей викликає фармакологічні проблеми, які виникають з віком і рідше зустрічаються у дорослих. Тому дітям слід застосовувати засоби з цільовим віковим дизайном, це педіатричні засоби, які відповідають віку [25].

Одним з виживих питань при розробці таких засобів є вибір відповідної до віку лікарської форми.

Серед пероральних лікарських засобів льодяники, особливо для лікування та профілактики захворювань вуха, горла та носа, є помітною формою з особливими перевагами для педіатричного застосування [26]. Приємність є одним з ключових факторів сприйняття педіатричних пероральних лікарських засобів пацієнтами. Приємність визначається як загальна оцінка запаху, смаку, присмаку і текстури (відчуття в роті) лікарського засобу (зазвичай для

перорального застосування). Вона визначається властивостями активної речовини в готовій лікарській формі та способом застосування [25].

Льодяник - це лікарський засіб для слизової оболонки порожнини рота (оральний лікарський засіб). Це однодозові тверді препарати для інгаляцій, що зазвичай діють місцево в роті або горлі. Зазвичай містять одну чи більше активних речовин в ароматизованій солодкій на смак основі і призначені для повільного розчинення або розпаду в ротовій порожнині шляхом аспірації [26-30].

Перевагами є наступне: вони можуть використовуватися пацієнтами з труднощами ковтання; їх легко призначати геріатричним і педіатричним пацієнтам; комплаєнс пацієнтів хороший завдяки приємному смаку і простоті застосування; вони не потребують води для прийому; активна речовина довше залишається в порожнині рота для досягнення специфічного ефекту; вони проходять через печінку «за короткий час», щоб уникнути ефекту від «першого проходження» і запобігти системній екскреції в шлунково-кишковому тракті; їх легко приготувати, оскільки вони вимагають мінімального обладнання та часу; неінвазивний прийом не потребує спеціальної техніки, як, наприклад, при введенні препаратів через шлунок; вони легкі для транспортування [28-30].

Однак використання льодяників також має деякі недоліки, один з яких полягає в тому, що діти можуть сплутати їх з цукерками. Цей недолік є серйозним обмеженням використання їх у педіатричній роботі, коли активними інгредієнтами є анестетики, анальгетики або антибіотики особливо, але обмеження це не суттєве у варіанті пробіотичних інгредієнтів з доведеною безпекою для людини. Інші недоліки включають нерівномірний розподіл активної речовини в слині та випадкове її проковтування зі слиною, що важливо при місцевому лікуванні [26].

Зараз з лікувальною метою використовуються жувальні льодяники з желатину або карамелі, до яких додають збиваючі речовини або зволожувачі для отримання м'якої жувальної маси; м'які льодяники або пастилки з синтетичних або натуральних полімерів, каучуку та ароматизаторів; пресовані

льодяники з цукрів, носіїв і наповнювачів. Ці суміші піддаються пресуванню чи мокрому гранулюванню після додавання активних інгредієнтів. Цукрові сиропи, які застигли, можна визначити як льодяники на основі цукру та інші вуглеводи, які знаходяться в склоподібному та аморфному стані [26, 27, 31].

До льодяників входять ті речовини, що сприяють приємному смаку препарату, що має позитивний ефект для дітей. Задовільне сприйняття пероральних педіатричних препаратів пацієнтами має велике значення, і солодкість відіграє важливу роль в цьому. Вибір і концентрація ароматизатора залежить від діючої речовини і застосування ароматизаторів. У педіатричних засобах, які призначені для тривалого використання, слід уникати високих доз та частого застосування підсолоджувачів, враховувати можливий вплив на біодоступність. Використання цукрів, які викликають карієс, має бути ретельно обґрунтованим [25].

Цукри, які надходять з їжею, ферментуються слиною в порожнині рота, утворюючи пропіонову, масляну та мурашину кислоти, які вимивають кальцій і фтор з емалі зуба та більшою мірою з дентину, спричиняючи дефекти останнього. Слід зазначити, що різні види цукру на зуби впливають по-різному. Сахароза є найбільш ферментованою і тому виробляє найбільше кислот, що значно змінює рН у ротовій порожнині та провокує карієс. Фруктоза та глюкоза і менш схильні до ферментації, але все одно становлять ризик для зубів. Маніт, ксиліт, та сорбіт перетворюються менш активними ферментами на фруктозу, тому вони мало впливають на розвиток карієсу [32].

Іншою причиною карієсу зубів є наявність карієсогенних мікроорганізмів, таких як деякі види стрептококів (особливо *S. mutans*, *S. sanguis* і *S. salivarius*) і лактобактерій (наприклад, *L. casei*, кількість яких значно збільшується при карієсі). Вони ферментують цукри до молочної кислоти, роблячи середовище кислим, що спричиняє вимивання кальцію та карієс на поверхні зуба [32, 33].

Таким чином, льодяники є перспективними для профілактики та лікування ЛОР-захворювань, які застосовуються в педіатричній практиці, але при їх розробці треба дотримуватися обережності, бо вони містять високий

вміст цукрів, що спричиняють руйнування зубної емалі та збільшують активність карієсогенної мікрофлори.

З огляду на вищезазначене, використання сорбіту та ксиліту у виробництві є перспективним, оскільки вони надають продукту приємного солодкого смаку, але не ферментуються бактеріями. Крім того, використання невеликих кількостей ксиліту здатне ремінералізувати поверхні зубів, відновити кислотно-лужний баланс, створити пригнічувальні умови для карієсогенної мікрофлори і, таким чином, стабілізувати власний мікробіом.

Що стосується мікробіому порожнини рота, слід зазначити, що між мікро і макроорганізмами існує тісний симбіотичний зв'язок. Це один з важливих механізмів місцевого неспецифічного імунітету, бо представники нормальної мікробіоми конкурентно модифікують або запобігають утворенню колоній патогенної мікрофлори на слизовій оболонці.

Підтримка та стимуляція мікробіому порожнини рота це ефективний факторо пригнічення розвитку мікроорганізмів, які викликають захворювання вуха, горла та носа. Усвідомлення того, що захворювання пов'язані з мікробіомним дисбалансом порожнини рота, призвело до дослідження нового аспекту пробіотиків, який назвали «оральні пробіотики» [34].

Через це розробка пероральних лікарських засобів, що містять льодяникові пробіотичні компоненти на основі сорбіту або ксиліту, може розширити спектр терапевтичних засобів для лікування захворювань вуха, горла та носа, особливо для дітей.

1.3 Характеристика льодяників, як потенційної форми для лікування ЛОР-захворювань

Кондитерські вироби (лат. *conditio* - надавати запах, смак, підсолоджувати) - це тверда лікарська форма (ЛФ), що містять високу частку цукру або замінників цукру.

Вони відрізняються за формою та в'язкістю, містять лікарські інгредієнти та основу, яка повільно розчиняється у воді. Колись кондитерські лікарські

засоби мали дуже широкий асортимент у фармацевтичній промисловості і залишаються важливою частиною галузі і сьогодні, хоча їх форма значно змінилася. У більшості випадків кондитерські лікарські засоби містять сплав патоки і цукру в основі [9].

Назва «кондитерські вироби», що використовується для цієї групи, є умовною і це не фармацевтичний термін. Наразі до цієї групи відносять лише кілька фармацевтичних продуктів, таких як льодяники, жувальні цукерки, пастилки та жувальні гумки. Але сучасні тенденції фармацевтичних технологій, такі як розширення асортименту лікування ЛОР-захворювань, показують те, що розробка та вдосконалення таких засобів є дуже перспективним, особливо з огляду на потреби педіатричного застосування. Кондитерські лікарські засоби користуються великою популярністю серед населення та практикуючих лікарів. Лікарі призначають кондитерські лікарські засоби пацієнтам, які не можуть ковтати тверді лікарські засоби або яким необхідно уповільнити всмоктування ліків через слизові оболонки рота і горла [12].

Карамель (синонім льодяники та льодяникові таблетки) - це тверді дозовані пероральні лікарські форми з великою кількістю інвертного цукру, виготовлені шляхом змішування лікарського засобу в застиглому цукровому сиропі, для застосування при лікуванні деяких захворювань ротової порожнини, горла та шлунково-кишкового тракту [7]. Карамель в основному використовується як антисептичний (також рослинний), антибактеріальний та протигрибковий засіб і найчастіше застосовується як анестезуючий та антибактеріальний засіб для запальних захворювань у горлі [9]. Препарат також містить пробіотичний компонент, який на сьогодні є перспективним.

До льодяникових недоліків можна віднести: потенційну можливість неконтрольованого вживання льодяників дітьми, на упаковці має бути розміщена попереджувальна етикетка. Вони містять цукор, і це слід враховувати або замінити іншими інгредієнтами, якщо їх призначають діабетикам або тим, хто дотримується низькокалорійної дієти [9].

Промислове виробництво різноманітних кондитерських виробів наразі

здійснюється шляхом відливання у форми, пресування карамельних джгутів та за допомогою таблетувальних машин. Речовини повинні бути стабільні при температурі від вісімдесяти до дев'яноста градусів за Цельсієм. Це пов'язано з твердінням маси за температури нижче цієї, що спричиняє проблеми при введенні ліків [7]. Однак у випадку з терморозчинними компонентами, такими як живі мікроорганізми, температуру плавлення цукру можна знизити, використовуючи консерванти або додаючи специфічні інгредієнти.

Льодяники виготовляють шляхом змішування з цукровим сиропом або патокою цукру чи інших вуглеводів. Уварюють масу до 0,5-1,5% вологості. Наповнювачі мають дію зволоження і позитивно впливають на сухість і дискомфорт слизової оболонки порожнини рота та біль у горлі. Деякі активні речовини всмоктуються слизовою оболонкою язика та щік і захищають від метаболізму в кишечнику та шлунку діючу речовину [19].

Виробництво складається з наступних стадій:

1. Виробництво карамельного сиропу;
2. Виробництво льодяникової маси;
3. Її охолодження і обробка;
4. Формування;
5. Пакування та зберігання.

1. Виготовлення сиропу.

Виготовляють його різними способами, найпоширенішим з яких є розчинення цукру в водно-паточному розчині під тиском. Зі збільшенням тиску вона гріється до високої температури. Це скорочує процес розчинення цукру в невеликій кількості води і запобігає розщепленню цукру на глюкозу і фруктозу. Просіяний і магнітно сепарований цукор безперервно подається в циліндр з сорочкою пару з бункера; меляса, нагріта до 65°C, і вода, нагріта до 45°C, безперервно подаються в циліндр насосом-дозатором; на 10 кг цукру додають 5 кг меляси і 1,58 літра води. Усередині змішувача знаходяться два горизонтальних вали з лопатями, розташованими паралельно і встановленими під фіксованим кутом. Коли вали обертаються і стикаються один з одним,

суміш інтенсивно перемішується і транспортується до вихідного отвору. З змішувача вона потрапляє в збірку і подається насосом-дозатором в змійовики варильної колони, які безперервно обігрівуються парою. Гідравлічний опір і діафрагма, розміщена на виході змійовика з колони, створюють надлишковий тиск в змійовику. Цукор розчиняється протягом 90 секунд. Температура підвищується до 105°C, випаровується вода та отримують карамельний сироп.

2. Отримання льодяникової маси.

Для уварювання сиропу використовується безперервна вакуумна система, що складається з трьох секцій: секції нагріву, випарної секції та сепаратора-пастки. З сиропного бака подається сироп в подвійний змійовик варильної вежі знизу під тиском 0,4 МПа. Спочатку він піднімається у внутрішній змійовик, а потім по вертикальній з'єднувальній трубі потрапляє в нижній змійовик зовнішнього змійовика, де по змійовику піднімається вгору. Одночасно з верхнього патрубку в нагрівальну секцію апарату подається пара, вона омиває і конденсує змійовики. З змійовика маса при температурі близько 150°C проходить по трубопроводу і нагріває конічну камеру вакуум-апарату, де за рахунок інтенсивного випаровування в порожнині маса уварюється до вологості 1%. Вторинна пара виділяється з сиропу і проходить в конденсатор через пастку, де охолоджується і конденсується з водою. Пастка-сепаратор затримує частинки. Після того, як вторинна пара потрапляє в конденсатор, вона займає об'єм (до 10 м³ на 1 кг пари). Швидке зменшення об'єму створює розрідження. У конденсаторі утворюється суміш, яку відкачують поршневым вакуумним насосом. Коли у вакуумній камері накопичується певна кількість готової маси, її можна в будь-який момент відкачати. Вакуум допомагає знизити температуру під час приготування. Весь процес займає 1,5-2 хвилини при вакуумі 8-15 кПа, а температура під час вакуумування становить 115-120°C.

3. Охолодження та обробка льодяникової маси.

Маса охолоджується до 90 °C в охолоджувальній машині. Під час охолодження до гранул за допомогою дозатора додають ароматизатори,

лікарські препарати, пасти та ефірні олії. Потім гранули розминають на маркованому конвеєрі, щоб забезпечити рівномірний розподіл допоміжного розчину і видалити великі бульбашки повітря. Температура гранул стабілізується і досягає 75-80°C..

4. Формування.

Цукрову масу згортають у джгути при 70-80°C. Для виготовлення джгута з пластичної маси в карамелепрокатній машині готують конусоподібні карамельні батончики, а потім витягують карамельні пачки з верхівки конуса при 75-80°C. Джгути витягуються і калібруються за допомогою пучкового знімача. Якщо льодяники виробляються індивідуально, пачки подаються в карамелеформувальну машину. Основною частиною цієї машини є зубчастий диск з закріпленими ножами. Вони розміщені з усіх боків диска. З обертанням леза поступово притискаються до диска і карамельні грона розділяються окремо на льодяники та відправляються в камери. Використовується форма для формування льодяників, розташована перпендикулярно до камери. Відформовані льодяники передаються на охолоджувальний конвеєр. Льодяники охолоджують до 35 °C для затвердіння та калібрують для формування захисного шару.

5. Зберігання.

Зберігають їх у приміщеннях з контрольованою температурою 15-20°C та вологістю 25-35% [15].

1.4. Проблема карієсогенності

Дуже важливо, щоб педіатричні пероральні препарати були прийнятними для пацієнтів, і солодкість відіграє важливу роль у цьому відношенні. Вибір і концентрація підсолоджувача залежні від властивостей діючої речовини і ароматизатора. У засобах тривалого застосування, треба уникати частого використання підсолоджувачів та високих доз, беручи до уваги їх потенційний вплив на біодоступність. Використання цукрів, які викликають карієс, має бути ретельно обґрунтованим [2].

Наразі споживачі занепокоєні канцерогенністю льодяників на основі сахарози. Багато цукрів (сахароза, мальтоза, фруктоза та глюкоза) є канцерогенними.

Карієс - це інфекція, яка пошкоджує зуб. Харчові цукри ферментуються слиною з утворенням пропіонової, масляної та мурашиної кислот, які видаляють кальцій і фтор з дентину та емалі і спричиняють втрату дентину. Слід зазначити, що різні види цукру мають різний вплив на зуби.

Сахароза є найбільш ферментованою і тому виробляє найбільше кислот, значно змінюючи рН у ротовій порожнині та провокуючи розвиток карієсу. Фруктоза і глюкоза менш схильні до ферментації, але все одно становлять ризик. Маніт, сорбіт та ксиліт перетворюються менш активними ферментами на фруктозу, тому вони мало впливають на карієс [4].

Наявність або відсутність канцерогенності визначають за допомогою методу оральної телеметрії рН, який використовує некомерційна організація Tooth Friendly International. У цьому стандартизованому методі рН тромбоцитів вимірюється за допомогою щонайменше чотирьох електродів, покритих тромбоцитами, під час або протягом 30 хвилин після вживання досліджуваної речовини. Продукти, що не зменшують рН тромбоцитів нижче 5,7 в умовах тестування, вважають некарієсогенними.



Рис. 1.1. Зовнішній вигляд впливання цукрів на зуби

Такі цукри, як глюкоза, фруктоза і мальтоза, використовуються у

виробництві льодяників для зменшення утворення карієсу та мають перевагу над формами з сахарозою в основі [14, 25]. У такому випадку може використовуватися кукурудзяний сироп (який може містити більшу кількість фруктози або мальтози). Кукурудзяна патока запобігає кристалізації глюкози, фруктози та мальтози і поглинає вільну воду, що міститься в цукровій масі. Проте всі ці цукри залишаються у роті і викликають карієс. Вони впливають також на рівень глюкози в крові, тому їх споживання обмежене для діабетиків.

Сорбіт та ізомальт є поліолами і використовуються для виробництва твердих цукерок, вони більш корисними та менш карієсогенні, ніж традиційні, виготовлені з кукурудзяного сиропу та сахарози 20:80 (з сухої речовини). Ці підсолоджувачі гігроскопічні і швидко кристалізуються з розплавлених або перенасичених розчинів, тому необхідно використовувати додаткові підсолоджувачі для виготовлення комерційно прийнятних твердих форм зі стабільністю, холоднотекучістю і адгезією, принаймні еквівалентними цукру, виготовленому з сахарози і кукурудзяного сиропу 80:20 (на основі сухої речовини). Поширеним є використання, сиропу без цукру (гідролізату гідрогенізованого крохмалю (HSH)), він містить поліоли з різними молекулярними розмірами, як правило, мальтит та/або сорбіт [10].

Поєднання HSH з сорбітом або ізомальтом не утворює нагрітої зварної маси, яку заливають у форму, вилити і застигати на плоскій або напівплоскій поверхні, або формувати за допомогою формувального обладнання, такого як валики або різакі. Ці поліоли менш калорійні, ніж сахароза, зв'язана в кукурудзяному сиропі та не канцерогенні, але можуть спричинити розлади шлунково-кишкового тракту.

Недоліком поліолів є викликання шлунково-кишкових розладів. Продукт зазвичай без подразнюючої дії на шлунково-кишковий тракт, якщо більша частина продукту всмоктується до потрапляння в товстий кишечник або проходить там з незначними змінами кількості чи без змін взагалі. Ступінь патології шлунково-кишкового тракту або полегшення дистресу, який відчувають споживачі твердих виробів, часто залежить від типу поліолу,

чутливості споживача та кількості спожитих виробів.

Тому є потреба розробки твердих цукерок зі зниженою карієсогенністю (бажано некаріогенних) та із задовільними сенсорними властивостями і стабільністю при зберіганні, що містять меншу кількість сахарози, не викликаючи шлунково-кишкового дискомфорту [18, 27].

Підсолоджувачі, такі як трегалоза, ізомальтулоза та еритритол, розглядаються також як прийнятні альтернативи сахарозі, а інуліни (лінійні та розгалужені), декстрини, сахарозосолод і полідекстроза знаходяться в стадії розробки.

Ізомальтулоза - це цукор, який можна використовувати як сипучий підсолоджувач для твердих льодяників. Ізомальтулоза (також звана палатинозою) - це глюкозо-фруктозний дисахарид, що складається з глюкози і фруктози, зі зниженим їх вмістом, з'єднаних в положеннях 1 і 6 відповідними атомами вуглецю. Ізомальтулозу у промисловості отримують із сахарози ферментацією. Перетравлюється вона повільніше за сахарозу, і тому має нижчу глікемічну реакцію, та може використовуватися діабетиками. Оскільки ізомальтулоза повільно перетравлюється в ротовій порожнині, вона не пошкоджує зуби. Недоліком вважають швидку кристалізацію з перенасичених розчинів або з аморфного склоподібного стану речовини. Тоді потрібні додаткові речовини для регулювання процесу кристалізації [22, 29].

Іншими словами, льодяники є перспективними для лікування та профілактики ЛОР-захворювань, що застосовуються в педіатрії, але до розробки їх складу слід підходити з особливою обережністю, оскільки вони містять високий відсоток цукрів, які руйнують зубну емаль та стимулюють карієс. Ксиліт та сорбіт є перспективними у виробництві льодяникових мас, оскільки вони надають продукту приємного солодкого смаку, але не викликають бактеріального бродіння. Крім того, використання невеликих кількостей ксиліту може ремінералізувати поверхню зубів, відновити кислотно-лужний баланс, створити інгібуючі умови для карієсогенної мікрофлори і, таким чином, стабілізувати мікробіом.

Багато пробіотиків, доступних сьогодні, використовують для нормалізації роботи шлунково-кишкового тракту. Але усвідомлення того, що велика кількість захворювань прямо (наприклад, пародонтоз, карієс, ЛОР-захворювання, кандидоз) або опосередковано (наприклад, серцево-судинні та іноді ожиріння) пов'язані з дисбалансом мікробіоти ротової порожнини, призвело до появи нового напрямку застосування пробіотиків. Враховуючи результати аналізів, розробка засобів для слизової оболонки, що містять льодяників на основі сорбіту або ксиліту як пробіотичні компоненти, може розширити асортимент препаратів для лікування або профілактики інфекційно-запальних захворювань ротової порожнини.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Обґрунтування підбору компонентів складу льодяників з пробіотичною активністю

В якості пробіотичних інгредієнтів для виготовлення льодяникових пероральних препаратів обрали *Lactobacillus fermentum* 90-ТС – традиційний пробіотичний штам з доведеною безпекою для людини, високою імуностимулюючою активністю щодо макроорганізмів та антагоністичною дією щодо умовно-патогенної мікрофлори, а також *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Проаналізувавши існуючі препарати та технології, ми обрали не лише живі бактерії, але й їх метаболіти (суміш численних біологічно активних та антибіотикоподібних речовин). Було вирішено працювати у обох напрямках і створити дві експериментальні серії: льодяники з живими культурами пробіотиків та льодяники з їхніми метаболітами.

Для виробництва льодяників використовували сорбіт та ксиліт. Ксиліт - це інгредієнт, на який останнім часом звернули увагу виробники карамелі завдяки його гарному смаку, прохолодному відчуттю, яке він дає при вживанні, низькій температурі плавлення його кристалів та антикарієсному ефекту. Ми обрали цю сировину, оскільки нам потрібно було зменшити негативний вплив цукру в дитячих продуктах, а також знизити температуру плавлення маси при використанні пробіотичних культур. Також, використання ксиліту в технології карамелі полегшує фарбування. Додавання барвників до цукрової маси з ксиліту надає яскраві, насичені кольори, і це важливо для привабливості дитячих форм.

Однак при виробництві ксилітвмісних карамелей у сучасній практиці до цукрової основи додають сорбіт, оскільки кристалізація ксиліту, тобто процес затвердіння карамелі на ранніх стадіях розплавленого стану, відбувається дуже швидко і незворотно, це призведе до втрати плинності та погіршення технологічних властивостей [35]. [35].

Крім сорбіту, для покращення переробки цукрової маси, з метою захисту біомаси від впливу температури та забезпечення рівномірного розподілу пробіотичної біомаси додають гуміарабік під час її додавання (запобігає кристалізації ксиліту і забезпечує рівномірний розподіл ліофілізованої біомаси загущувач, що виключає утворення бульбашок та грудочок, а також виступає пребіотичним компонентом під час перорального збору пробіотичних культур) [36], гліцерин - зволожує [26, 37], агент, який знижує в'язкість та чинить захисну і стабілізуючу дію на пробіотичні культури, та аскорбінова кислота як пребіотичний складник [38]. Для фарбування льодяників використовували барвник рисової ферментації, натуральний червоний барвник.

У дослідженні використовували класичні мікробіологічні та технічні методи виробництва льодяників. Метод Коха (прямий посів на чашки та підрахунок колоній і життєздатних клітин) використовували для визначення життєздатної кількості молочнокислих бактерій у тестах на сумісність з лікарськими інгредієнтами та в готових пероральних пробіотиках. Тест на умовну патогенність *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* (метод агарової дифузії (метод лунок) використовували для визначення антагоністичних властивостей метаболітів проти *E. coli* ATCC 8739.

Використовували також культивування пробіотиків на рідких поживних середовищах з подальшою фільтрацією через фторопластові фільтри, це виявилось перспективним для досліджень [39]. У процесі фільтрації для отримання метаболітів використовували фторопластові фільтри, надані в рамках договору про наукову співпрацю з Державним біотехнологічним університетом, факультетом технології матеріалів.

Дослідження з розробки технології та складу льодяникових пероральних форм у двох складах були проведені у 2023-2024 рр. на кафедрі біотехнології та хімії Сумського національного аграрного університету в ламінарному боксі з дотриманням асептичних правил. Удосконалення складу розробленої рецептури додаванням антигалітозних компонентів (ефірної олії імбиру, кориці,

м'яти перцевої та евкаліпту) проведено за вищезазначеною методикою.

2.2 Об'єкти досліджень

У дослідженні були використані наступні компоненти:

- *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 та *Lactobacillus fermentum* 90-ТЦ із з мікробіологічної колекції Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
- ефірні олії імбиру аптечного, м'яти перцевої, евкаліпту, китайської кориці, як антигалітозні компоненти (Ароматіка, Україна - виробник),
- структуроутворювачі маси льодяників (низька температура плавлення кристалів, це важливо для життя пробіотичних культур, ефект проти утворення карієсу) – ксиліт (ТМ Total Sweet, Healthy by Nature LTD, Англія - виробник), сорбіт (Барвіста, Україна - виробник),
- технологічні компоненти (попередження утворенню грудок та піни при виготвленні льодяникової маси, запобігання зацукренню, при розчиненні біомаси лактобактерій сприяють утворенню стійкої системи та виживаємості клітини) – гліцерин та гуміарабік (Хімпостачання, Україна),
- пребіотичний елемент (захист від пошкодження живі клітини та покращує відновлення клітин із льодяника) – натрію аскорбат (виробник - NutriBiotic Immunity, США),
- 1 –живі пробіотичні клітини, 2 –відфільтровані метаболіти лактобактерій.

Бактерії роду *Lactobacillus* - це грампозитивні, мікроаерофільні, паличкоподібні, неспороутворюючі, нерухомі, та некаталазоактивні мікроорганізми. Більшість представників - паличкоподібні бактерії із заокругленими кінцями, об'єднані у ланцюги різної довжини або прямі ланцюжки, розташовані поодиноці або по парам

Lactobacillus fermentum 90-ТЦ

L. fermentum - суміш довгих і коротких паличок 0,9 мкм у довжину.

Lactobacillus fermentum 90, штамп ТС-4, використовується у виробництві пробіотиків як лікарських засобів, дієтичних добавок та продуктів харчування. Вперше був виділений від здорових людей на кафедрі мікробіології Тартуський

національний університет (Естонія). Дослідження біологічних характеристик показали, що штам належить до *L. fermentum*. Цей штам добре піддається обробці і проявляє виражений антагонізм до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, детальні дослідження штаму і властивостей проводилися раніше лише фенотипічними методами. Згодом методи, вивчення генетичних детермінант включили в комплекс методів для вивчення та управління штамми-продуцентами і потенційними штамми-продуцентами, який відповідає МУК 4.2.2602-101 і МУК 2.3.2.2789-102 вимогам. Згідно цих документів, для придатності та безпеки пробіотиків штамми-продуценти повинні досліджуватися з використанням новітніх молекулярно-генетичних методів, щоб підтвердити відсутність генів стійкості до антибіотиків, острівців вірулентності, генів вірулентності та інтеграції [14, 28]. Однак цей метод все ще недостатній для характеристики пробіотичних штамів. NGS-секвенування геному штаму дає можливість провести детальний аналіз не тільки для визначення наявності або відсутності вищезазначених детермінант та їх геномного контексту, але й дослідити інші ділянки, як локус CRISPR. Аналіз цього локусу дозволяє зробити висновок, що клітини даного штаму взаємодіяли з фагом у минулому, і виявити перспективні маркери для внутрішньовидового типування; також безсумнівно в геномі штамів *Lactobacillus* визначаються шляхи транспорту і метаболізму цукру.



Рис. 2.1. *Lactobacillus fermentum* (за Грамом)

Для культивування лактобактерій використовували модифіковане середовище МРС, що складається з напіврідкого середовища з 0,15% агару (МРС-2) та концентрованого середовища з 2% агару (МРС-4); склад МРС, у г/л: пептон - 10 г/л; екстракт дріжджів- 20 г/л; глюкоза - 20,0 г/л; твін- 0,8 - 1,0 г/л; дикаліюгидрофосфат – 2 г/л.; ацетат натрію - 5,0 г/л; цитрат триамонію - 2,0 г/л; сульфат магнію - 0,2 г/л; сульфат марганцю ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) - 0,05 г/л; до 1 л м'ясної води; рН - $6,2 \pm 0,1$.



Рис. 2.2. Морфологія *Lactobacillus fermentum* на агаризованому середовищі

Lactobacillus plantarum 8P-A3 розвиваються за температури 15-45 °С. Оптимальна -30.



Рис. 2.3. *Lactobacillus plantarum* під мікроскопом.

Для культивування *Lactobacillus plantarum* використали рідке поживне середовище, що містило дріжджовий екстракт, пептон, вітаміни (B1, B5), стимулятори росту (сульфіт натрію, гемін), глюкозу, сіль та Твін-80. Лактобактерії інкубували в рідкому середовищі протягом 72 годин при 37°C в анаеробній культуральній системі. Під час росту культури через певний час відбирали зразки, щоб визначити кількість в одиниці об'єму мікроорганізмів, вивчення антимікробної активності та для аналітичних досліджень [4, 30].



Рис. 2.4. Морфологія *Lactobacillus plantarum* на агаризованому середовищі

Ефективними антигалітозними компонентами є рослинні засоби, особливо ефірні олії м'яти, імбиру, кориці та евкаліпта.

Ефірна олія евкаліпта. Евкаліптол, монотерпен 1,8-цинеол, є основним компонентом евкаліптової ефірної олії. Він діє проти грамнегативних і грампозитивних бактерій, деяких вірусів, найпростіших грибків і вірусів. Покращує дренаж миготливого епітелію дихальних шляхів і полегшує виділення мокротиння. Після нанесення на шкіру він має протисвербїжну та місцевоподразнювальну дію. У печінці 1,8-цинеол метаболізується до гідроксильованих похідних, які зв'язуються з глюкуроною кислотою.

Завдяки БАР, ментолу головним чином, який належить до терпенів, ефірні олії м'яти перцевої мають подразнювальні, антисептичні та анестезуючі властивості..

Ментол охолоджує слизові оболонки та шкіру, викликаючи печіння,

рефлекторне звуження судин і легку анестезію.

Відвар м'яти можна використовувати для полоскання при неприємному запаху, у ваннах та припарки для лікування свербіжних, нейродермітів і екзем. Листя м'яти прикладають також до чола, коли сильно болить голова, а сік використовують як мазь для пошкодженої грибковими інфекціями шкіри. Препарати м'яти мають седативну та легку гіпертензивну дію, підвищують секрецію травних залоз, перистальтику і апетит, знімають спазми в кишечнику, жовчовивідних шляхах і сечовипускальному каналі, підвищують жовчоутворювальну функцію печінки та секрецію жовчі в дванадцятипалу кишку. Стенокардія та спазми судин головного мозку лікуються ментолом як м'яким рефлекторним судинорозширювальним засобом [14, 19, 21].

Імбир в аптеках знижує подразнення горла своїм широким антибактеріальним спектром. Крім того, він зменшує запалення та має анестезуючі властивості. Таким чином, профілактика та лікування застуди - основне призначення імбиру. Його використовують як для запобігання, так і для лікування застуди. Протизапальні властивості кореня імбиру підвищують імунітет і захищають організм від паразитів і грибків.

Китайській кориці властива антисептичність, яка знищує різноманітні грампозитивні та грамнегативні бактерії та віруси. Британська та японська трав'яні фармакопеї включають кору кориці через її медичну користь. Її також використовують в європейській медицині, включена вона до Британської трав'яної фармакопеї. Дослідження показали, що ефірна олія кориці, відома як евгенол, має сильний бактерицидний ефект, порівняно з коричною кислотою. Евгенол – це ефірна олія кориці. Ця речовина має знеболюючі та анестетичні властивості. Олія кориці особливо ефективна в боротьбі з грибами *Candida*.

2.3 Методи досліджень

Ламінарний бокс кафедри біотехнології використовувався для проведення досліджень із дотриманням асептики під час розробки технології та складу оромукозного засобу (рис. 2.5).



Рис. 2.5. Розробка льодяників

У роботі використовували класичні технологічні прийоми та біотехнологічні методи:

1. забарвлення за Грамом - вивчають мікроскопічні властивості у пробіотичних бактеріях: штами *Lactobacillus fermentum* 90-ТЦ та *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Вони пропонують для створення таких препаратів, також дослідження штамів пробіотичних пробіотиків;
2. метод Коха - вивчають кількість життєздатних лактобактерій, їх використання та кількість життєздатних бактерій;
3. метод дифузії в агар використовують для визначення проти умовно-патогенних штамів, їх антагоністичної активності, їх метаболітів;
4. методи культивування в рідкому середовищі з фільтрацією через фторопластовий фільтр, який зарекомендував себе, як перспективний у біотехнологічних дослідженнях.

Для вивчення у роботі антимікробних властивостей застосовували як тест-штами:

- *Candida albicans* (дріжджоподібні гриби);
- *Staphylococcus aureus* (грампозитивні мікроорганізми);
- *Escherichia coli* (грамнегативні мікроорганізми);
- *Pseudomonas aeruginosa* (грамнегативні паличковидні

неспороносні бактерії).

Для процесу фільтрації з отриманням метаболітів з культурального середовища пробіотиків використовували фторполімерний фільтрувальний елемент (товщина мембрани 0,1 мм, діаметр пор 1 мкм) (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Фільтрація культуральної рідини через фторопластові фільтри в ламінарному боксі

РОЗДІЛ 3

ВИКОРИСТАННЯ ПРОБІОТИКІВ У СКЛАДІ ЛЬОДЯНИКІВ

3.1 Вивчення можливості використання пробіотичних культур сумісно з іншими компонентами

Було вивчено можливість використання пробіотичних культур з обраними інгредієнтами (ксиліт, гуміарабік, сорбіт, аскорбат натрію, антигалітозні інгредієнти та ферментований рис) у складі льодяникоподібних препаратів для слизової оболонки на першому етапі. Для цього штами *L. plantarum* та *L. fermentum* інкубували в рідкому МРС з відповідними компонентами льодяників 48 год при 37 градусах. Після коінкубації визначили кількість клітин у кожному досліді методом Коха. Порівняли з контролем (початковий вміст посівного матеріалу однаковий без компонентів). Коли кількість бактерій була нижчою за контроль, можна було стверджувати, що компонент не мав негативного впливу на культуру пробіотика і може бути використаний у рецептурі. Етапи експериментів проілюстровано на рисунку 3.1 (А, Б та В).

Дослідження використання маси пробіотичних культур сумісно із компонентами льодяникової:

А - культивування культур у МРС сумісно з компонентами льодяникової маси

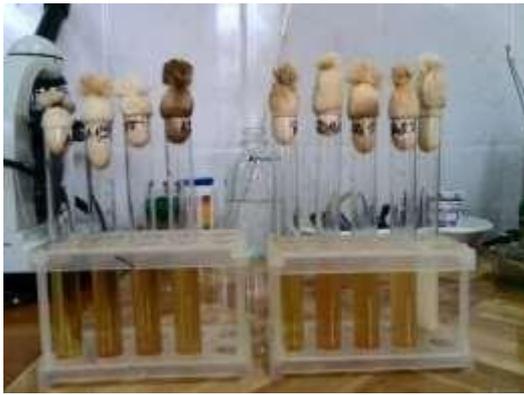
Б - інкубовані з компонентами культури пробіотиків (постійне розведення) висівають на поверхню агарового середовища.

В - колонії пробіотичних культур після культивування з компонентами (мінімальне розведення; використовували для підрахунку розведення, на чашці Петрі виросло до 50 колоній)

Результати використання *L. plantarum* 8P-A3 та *L. fermentum* 90-ТЦ сумісно з компонентами льодяникової маси в табл. 3.1 та 3.2.

Порівняння результатів з таблиць 3.1 і 3.2, показує, при використанні пробіотичних культур сумісно з структуроутворювачами кількість клітин не була нижчою за контроль, це свідчить про можливе спільне використання в цукерках з антигалітотичними властивостями. Додавання аскорбату натрію та гуміарабіку також збільшило проліферацію, це доводить їх потенційне використання в якості

пробиотичних інгредієнтів. Супутнє використання антигалітозних інгредієнтів, таких



А



Б



В

Рис. 3.1 Дослідження використання маси пробиотичних культур сумісно із компонентами льодяникової

як ефірні олії м'яти та евкалипта, призвело до зменшення кількості життєздатних клітин і було виключено з подальших досліджень. На противагу цьому, ефірні китайської кориці та олії імбиру не викликали зменшення кількості клітин пробиотичної культури.

У другій серії льодяників було вирішено використовувати їх метаболіти. Інкубували культури пробиотиків при 37 градусах протягом 72 годин і фільтрували через фторполімерний фільтрувальний елемент. Отриманий таким чином розчин метаболітів перевірили на агаровому середовищі дифузцією в повільно зростаючу частину культури і тестувався на відсутність та наявність антимікробних властивостей до умовно-патогенних штамів і представників мікрофлори. Етапи цієї серії експериментів показані на рис. 3.2 (А-Г).

**Результати можливості використання
L. fermentum 90-ТЦ сумісно з компонентами льодяників**

| Назва компоненту | Чисельність мікроорганізмів КУО*/мл |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ксиліт (структурний) | $(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ |
| Сорбіт (структурний) | $(6,3 \pm 0,2) \times 10^8$ |
| Гуміарабік (пребіотик, технологічний) | $(5,3 \pm 0,1) \times 10^9$ |
| Аксорбат натрію (пребіотик, технологічний) | $(3,8 \pm 0,1) \times 10^9$ |
| Ферментований рис (барвник) | $(4,2 \pm 0,1) \times 10^8$ |
| Ефірні олії (антигалітозний): | |
| Евкалипт | $(1,2 \pm 0,05) \times 10^7$ |
| М'ята перцева | $(2,3 \pm 0,3) \times 10^6$ |
| Імбир | $(3,6 \pm 0,1) \times 10^8$ |
| Кориця китайська | $(3,5 \pm 0,3) \times 10^8$ |
| Контрольний | $(3,15 \pm 0,1) \times 10^8$ |

Примітки: Посівна доза= $(0,58 \pm 0,3) \times 10^3$

* КУО - колонієутворювальні одиниці; n = 5, p = 95.

**Результати можливості використання
L. plantarum 8P-A3 сумісно з компонентами льодяників**

| Назва компоненту | Чисельність мікроорганізмів КУО*/мл |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ксиліт (структурний) | $(1,5 \pm 0,2) \times 10^8$ |
| Сорбіт (структурний) | $(6,0 \pm 0,2) \times 10^8$ |
| Гуміарабік (пребіотик, технологічний) | $(1,8 \pm 0,2) \times 10^9$ |
| Аксорбат натрію (пребіотик, технологічний) | $(1,9 \pm 0,4) \times 10^9$ |
| Ферментований рис (барвник) | $(2,5 \pm 0,1) \times 10^7$ |
| Ефірні олії (антигалітозний): | |
| Евкаліпт | $(2,2 \pm 0,1) \times 10^6$ |
| М'ята перцева | $(1,7 \pm 0,1) \times 10^6$ |
| Імбир | $(2,0 \pm 0,1) \times 10^7$ |
| Кориця китайська | $(3,0 \pm 0,1) \times 10^7$ |
| Контрольний | $(1,8 \pm 0,1) \times 10^7$ |

Примітки: Посівна доза= $(0,75 \pm 0,2) \times 10^3$

* КУО - колонієутворювальні одиниці; n = 5, p = 95.

Результати цих експериментів (табл. 3.3) продемонстрували наявність у метаболітів *L. fermentum* 90-ТС та *L. plantarum* 8P-A3 антимікробних властивостей щодо штамів та відсутність негативного впливу на пробіотичні культури.



А



Б



В



Г

Рис. 3.2. Етапи визначення антимікробних властивостей метаболітів:

А - отримання метаболітів,

Б - додавання їх до лунок,

В - вплив метаболітів на пробіотичні культури (відсутність затримки росту означає відсутність антимікробного впливу на представників нормофлори)

Г - вплив на тест-культури метаболітів (наявність затримки росту означає наявність антимікробного впливу на представників нормофлори)

Визначення антимікробних властивостей метаболітів

| Тестова культура | Затримка в рості, мм | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | <i>L. fermentum</i> 90-ТС | <i>L. plantarum</i> 8P-A3 |
| ATCC 10231 (<i>C.albicans</i>) | 18±0,5 | 15±0,5 |
| ATCC 6538 (<i>S.aureus</i>) | 18,5±0,5 | 19±0,5 |
| ATCC 8739 (<i>E.coli</i>) | 11±0,6 | 17±0,7 |
| ATCC 9027 (<i>P.aeruginosa</i>) | 17,6±0,5 | 20±0,3 |

3.3. Відпрацювання технології виробництва льодяників з пробіотиками

На основі теоретичних досліджень та власних попередніх досліджень ми запропонували дві рецептури - живі пробіотичні культури (ліофілізована біомаса *L. fermentum* 90-ТС та *L. plantarum* 8P-A3 1:1 співвідношення, загальне бактеріальне число 1×10^{10} КУО/мл) та їх метаболіти (розчин 1:1 *L. plantarum* 8P-A3 та *L. fermentum* 90-ТС).

Компоненти були відібрані відповідно до показників якості, запропонованих для стандартизації продукту: органолептичні характеристики (зовнішній вигляд, липкість, смак), середня маса та відхилення, розпадаємість, вологість, кількість життєздатних бактерій, відсутність сторонньої мікрофлори. Препарат для слизової оболонки порожнини рота форми льодяника (композиція 1), що містить обрані інгредієнти, був виготовлений за наступними методиками (рис. 3.3):

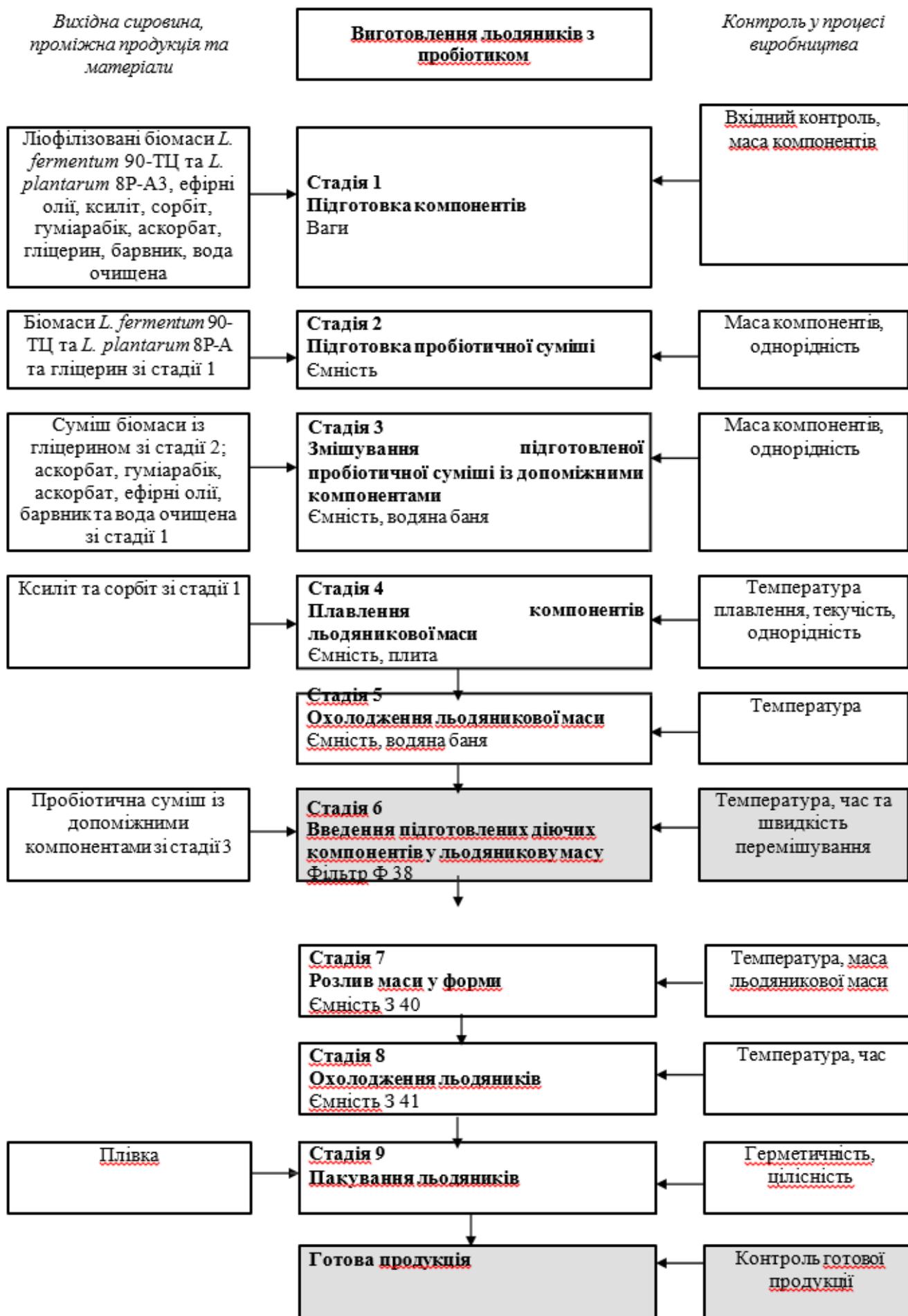


Рис. 3.3 - Технологічна схема виробництва

- на основі ксиліту плавили (80 мас. %), додавали сорбіт (4 мас. %) з температурою 100-110 °С);
- охолоджували до нижче температури плавлення (80-90 °С), потім кристали ксиліту відокремлювали осадженням, для отримання текучої суспензії;
- змішували аскорбінову кислоту (1 мас. %) із біомасою пробіотика (1,2 мас. % г), попередньо змішаною з гуміарабіком (1 мас. %), гліцерином (0,4 мас. %) 3:1, ефірною олією аптечного імбиру (0,25 мас. % г) та китайської кориці (0,25 мас. % г) з барвником (0,5 мас. %) розчиняли до однорідності у теплій воді (температура 30 °С);
- отриману суспензію додавали у масу під час охолодження (50-60 °С) при швидкому та ретельному перемішуванні для скорочення часу контакту компонентів та запобігання кристалізації цукрів;
- композицію розливали у силіконові форми та охолоджували до твердіння (20 °С).

При створенні препарату композиції 2 при змішуванні суміші з допоміжними інгредієнтами з розчином метаболітів (9 % мас.), попередньо змішаним з гліцерином (3 % мас.) 3:1, гуміарабіком (1 % мас.), барвником (0,5 % мас.) змішували аскорбінову кислоту (1 % мас.), розчиняли у воді до однорідності (температура 30 градусів); решта стадій відповідала попередній технології.

3.4. Визначення ефективності льодяників

Стандартизація розроблених льодяників проводилась за наступними показниками якості:

- органолептичні показники (смак, клейкість, зовнішній вигляд);
- маса (середня) та відхилення; однорідність (за кількістю життєздатних бактерій) маси та вмісту;
- розчинення;
- нестача сторонньої мікрофлори;
- кількість живих лактобактерій.

Ефективність оцінили за властивостями розроблених продуктів, тобто за

загальною кількістю життєздатних клітин для першого складу та збереження антимікробних властивостей для другого складу. До тестування льодяники подрібнювали і розчиняли у воді (теплій та стерильній) 10:1. Результати ефективності льодяників розроблених складів 1 та 2 в таб. 3.4 та 3.5.

Таблиця 3.4

Кількість життєздатних клітин (склад 1)

| Номер складу льодянику | Початкова кількість мікроорганізмів, КУО/мл | Чисельність мікроорганізмів у льодянику, КУО*/мл |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1 | 10 млрд | 6,5±0,1 млрд |

Результати тестування, наведені в таблиці 3.4, показують, що кількість мікроорганізмів зменшилася, але ефективна доза (1x10¹⁰ КУО/мл).

Таблиця 3.5

Антимікробні властивості (склад 2)

| Тестова культура | Затримка в рості, мм |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ATCC 10231 (<i>C.albicans</i>) | 15±0,7 |
| ATCC 6538 (<i>S.aureus</i>) | 14,5±0,5 |
| ATCC 8739 (<i>E.coli</i>) | 9±0,6 |
| ATCC 9027 (<i>P.aeruginosa</i>) | 14,6±0,5 |

Результати досліджень, наведені в таблиці 3.5, показують, що антимікробні властивості льодяників з метаболітами зберігаються.

У ході серії досліджень розробили препарат для слизової оболонки порожнини рота, що містить льодяникоподібні пробіотики двох складів (на основі живих пробіотичних культур і метаболітів). Після досліджень та визначення безпечності цей препарат є дієтичною добавкою, яка підтримує мікрофлору ротової порожнини, стимулює власний імунітет і може бути рекомендована при інфекційних

захворюваннях як засіб лікувально-профілактичний, в тому числі при шлунково-кишкових проблемах.

ВИСНОВКИ

1. У роботі розглядаються теоретичні питання, пов'язані з використанням пробіотичних культур для лікування інфекційно-запальних захворювань, особливо для галітозу та захворювань порожнини рота. Показали, що інфекційно-запальні захворювання ротової порожнини у дітей - це проблема медичного та психологічного характеру (останнє пов'язане з необхідністю застосування засобів, які привабливі на смак та на вигляд).

2. Провели теоретичний аналіз наявних пробіотичних препаратів на ринку для лікування оториноларингологічних захворювань, проаналізовано можливі інгредієнти та технології, підібрано композиції та технології для отримання перорального пробіотичного продукту форми льодяників, для застосування в педіатрії.

3. Дослідження штамів *L. plantarum* 8P-A3 та *L. fermentum* 90-TC показали їх потенціал використання у складі пероральних пробіотичних продуктів. Запропоновано використання метаболітів цих штамів як діючих речовин з достатньо високою антимікробною активністю проти мікроорганізмів, які викликають інфекційні оториноларингологічні захворювання, а також застосування ефірних олій з традиційних рослинних засобів проти неприємного запаху з рота.

4. Вибрані інгредієнти льодяників: сорбіт - зменшує температуру плавлення та час незворотної кристалізації цукрів; ксиліт – безпечніший аналог цукру; гуміарабік - промотор ліофілізації сублімованої бактеріальної біомаси та загущувач; аскорбат натрію - вітамінний та бактеріальний захисний агент; гліцерин - зволожуючий агент, що зменшує в'язкість і має захисну і стабілізуючу дію на пробіотичні культури, як натуральний барвник використовували ферментований рис. Вибрані інгредієнти є натуральними і, за словами виробника, безпечними у використанні, в тому числі для дітей.

5. Наші дослідження показали потенціал використання основних і допоміжних інгредієнтів разом з пробіотичними культурами. Крім того, інгредієнти гуміарабік та аскорбат натрію мають пребіотичні властивості, які дозволяють добре та швидко активувати бактерії при потраплянні в ротову порожнину.

ПРОПОЗИЦІЇ

Оральні пробіотичні препарати у вигляді льодяників двох складів із живих молочнокислих бактерій і метаболітів цих бактерій, вироблені за обраними методиками, показали високі гістологічні властивості та ефективність, виживання бактерій та антибактеріальні властивості. У ході серії теоретичних, мікробіологічних і технічних досліджень були розроблені препарати для слизової оболонки порожнини рота, що містять пробіотики двох складів у формі льодяників (з культур пробіотиків і їх метаболітів), які можуть бути рекомендовані як дієтичний продукт після проведення досліджень і визначення безпечності для мікрофлори порожнини рота. Може бути рекомендований як дієтична добавка, що підтримує та стимулює власний імунітет, а також при інфекціях оральної порожнини та захворюваннях шлунково-кишкового тракту як лікувально-профілактичний засіб.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hutkins, R., Merrifield, C. A., Merenstein, D., et al. Probiotics for human use. Nutrition Bulletin, Aug 10. 2018 DOI: <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>.
2. Food and Agricultural Organization/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agricultural Organization, Rome, Italy, 2002. Available at: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
3. Vrese, M., Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Adv Biochem Eng Biotechnol., 2008, 111, 1–66. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2008_097.
4. Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos W.M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr Opin Biotechnol. 2005, 16, 204–211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>
5. Gao, L., Xu, T., Huang, G., et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. Protein Cell, 2018, 9, 488-500. DOI: 10.1007/s13238-018-0548-1.
6. Expanded Human Oral Microbiome Database. Available at: <http://www.homd.org/>.
7. Ahrne, S, Nobaek, S, Jeppsson, B, Adlerberth, I, Wold, A.E., Molin, G. The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. J Appl Microbiol, 1998, 85, 88–94. DOI: [10.1046/j.1365-2672.1998.00480.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00480.x).
8. Maukonen, J, Mätto, J, Suihko, M.L., Saarela, M. Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota. J Med Microbiol., 2008, 57, 1560– 1568. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47352-0>.
9. Rotimi, V.O., Duerden, B.I. The development of the bacterial flora in normal neonates. J Med Microbiol, 1981, 14, 51–62. DOI: <https://doi.org/10.1099/00222615-14-1-51>.
10. Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V. Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and Bifidobacterium denticolens sp. nov., two new

species isolated from human dental caries. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46, 564–571. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-564>

11. Beighton, D., Gilbert, S.C., Clark, D., Mantzourani, M., Al-Haboubi, M., Ali, F. et al. Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74, 6457–6460. DOI: 10.1128/AEM.00895-08

12. Expanded Human Oral Microbiome Database. Available at: <http://www.homd.org/>.

13. Крючко, Т. О., Ткаченко, О. Я. Клінічний досвід застосування *Streptococcus salivarius* K12 у профілактиці фаринготонзилітів і респіраторних інфекцій у дітей. *Здоровье ребенка*, 2018, Т. 13, № 7, 629-634.

14. Naukioja, A. Probiotics and Oral Health. *Eur J Dent*, 2010, 4(3), 348–355.

15. Nikawa, H., Makihira, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, Y., Ishida, K., et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol*, 2004, 95, 219–223.

16. Caglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., Selvi, S.. Effect of yoghurt with *Bifidobacterium* DN-173010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odont Scand*, 2005, 63, 317– 320.

17. Caglar, E., Cildir, S.K., Ergeneli, S., Sandalli, N., Twetman, S.. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand*, 2006, 64, 314–318.

18. Kragen, H. The treatment of inflammatory affections of the oral mucosa with a lactic acid bacterial culture preparation. *Zahnarztl Welt*, 1984, 9, 306–308.

19. Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A., Sinkiewicz, G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J*, 2006, 30, 55–60. Available at: <https://europepmc.org/article/med/16878680/reload>

20. Della Riccia, D.N., Bizzini, F., Perilli, M.G., Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis*. 2007, 13, 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x>

21. Twetman, S., Derawi, B., Keller, M., Ekstrand, K., Yucel-Lindberg, T.,

Stecksen-Blicks, C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.* 2009, 67, 19–24.

22. Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K., et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, 2008, 35, 897–905. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x>

23. Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y., et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21- containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo- controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 2009, 36, 506–513. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x>

24. Годована, О. І., Бежук, Ю. А. Перебіг тонзиллярної інфекції та захворювань пародонту в світлі окремих аспектів етіології та патогенезу (огляд літератури). *Вісник проблем біології і медицини*, 2019, Вип. 2, Т. 2 (151), 24-29. DOI: 10.29254/2077-4214-2019-2-2-151-24-29.

25. СТ-Н МОЗУ 42-3.15:2014 Лікарські засоби. Фармацевтична розробка лікарських засобів для педіатричного застосування. Джерело: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-15-2014/>

26. Гордієнко, О. І., Грошовий, Т. А., Сучасний стан створення, виробництва та дослідження таблетованих лікарських препаратів. Повідомлення 27. Основні аспекти виготовлення лікарських засобів у формі ледяників, *Фармацевтичний часопис*, 2017, № 1, 74-80.

27. Державна Фармакопея України, Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2, Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008, 620 с.

28. Sondarva, K., Bhadra, S. Development of cefixime lozenge for the treatment of throat infection, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015, Vol. 4 (7), 64-56.

29. Modyala, D., Aparna, C., Srinivas, P. Formulation, evaluation and characterization of itraconazole lozenges, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological*

Sciences, 2014, Vol. 9 (3), 86-94.

30. Allen L. V. Troches and Lozenges / L. V. Allen // *Secundum artem. Current & practical compounding information for the pharmacist.* - 2001. - Vol. 4 (2). - P. 23-25.

31. Pundir S. A Review on lozenges / S. Pundir, A. M. L. Varma // *J. der Pharma. Forschung.* - 2014. - Vol. 2 (1). - P. 1–10

32. Перспективність розробки оральних пробіотиків у вигляді льодяників / У. А. Старущенко, О. С. Калюжная // *Сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та виробництва: міжгалузеві диспути: збірник наукових праць XII Міжнародної науково-практичної інтернет- конференції, 29 січня 2021. ISSN: 2708-1257.*

33. Vrushali P, Shahana S, Sanket J, Harsha Vardhan Reddy P., Rukmender, Sagarla A, Pothugunta S. Validating antibacterial efficacy of essential oils combinations against dental caries pathogens. *Research & Reviews: Journal of Dental Sciences.* 2019 Mar. Available from: <http://www.rroj.com/openaccess/validating-antibacterial-efficacy-of-essential-oilscombinations-against-dental-caries-pathogens.php?aid=87525>.

34. Леженко, Г.О., Пашкова, О.Є. (2016). Рациональный выбор этиотропной терапии при воспалительных заболеваниях лор-органов у детей. *Современная педиатрия*, № 1 (73), 44-48.

35. Majekodunmi, S. O. A Review on Lozenges. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2015, 5(2), 99-104.

DOI:10.5923/j.ajmms.20150502.07.

36. Pundir, S. A., Varma, A. M. L. Review on lozenges. *J. der Pharma. Forschung.*, 2014, Vol. 2 (1)., 1–10.

38. Калюжная, О. С., Калюжный, О. Б. Використання фторопластових фільтруючих елементів у біотехнологічному виробництві антибіотичних речовин. *Технічний сервіс агропромислового, лісового та транспортного комплексів*, 2020, №22, 84-89. DOI: <https://doi.org/10.37700/ts.2020.22.84-89>.