

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Получение и исследование пленок бактериальной целлюлозы в качестве  
основы для косметических масок

Руководитель

\_\_\_\_\_  
подпись

доцент, к.б.н.

\_\_\_\_\_  
должность, учёная степень

А.А. Шумилова

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
подпись

В.В. Бротт

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Красноярск 2020

## Содержание

Введение.....	4
1.Обзор литературы .....	6
1.1.Природные полимеры в медицине .....	6
1.2. Синтез и свойства бактериальной целлюлозы.....	9
1.3. Применение бактериальной целлюлозы.....	13
1.3.1. Применение БЦ в пищевой промышленности.....	13
1.3.2. Применение БЦ в медицине .....	14
1.3.3. Применение БЦ в косметической промышленности .....	16
1.4. Компоненты для косметических масок .....	18
2.Материалы и методы исследования.....	21
2.1. Получение бактериальной целлюлозы .....	21
2.2. Исследование свойств пленок БЦ .....	22
2.3. Исследование свойств адсорбции и десорбции пленок БЦ.....	24
2.4. Исследование способности БЦ поддерживать рост и адгезию клеток .....	25
2.5 Оценка жизнеспособности фибробластов.....	25
2.6. Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI .....	26
2.7. Статистический анализ данных.....	26
3. Результаты и обсуждения исследований .....	28
3.1. Получение пленок бактериальной целлюлозы .....	28
3.2. Характеристики пленок БЦ.....	29
3.3. Электронная микроскопия .....	30
3.4. Свойства поверхности пленок БЦ.....	31
3.5. Физико-механические характеристики пленок БЦ .....	32
3.6. Адсорбционные и десорбционные свойства пленок БЦ.....	33
3.7. Исследование утилизации субстрата при выращивании БЦ.....	35
3.8. Исследование адгезионных свойств пленок БЦ в культуре клеток .....	35
Выводы .....	38

Список используемых источников.....	39
-------------------------------------	----

## Введение

В настоящее время производство бактериальных экзополисахаридов (ЭПС) считается одной из наиболее многообещающих областей биотехнологии [1]. Особенное внимание привлекает бактериальная целлюлоза (БЦ), которая не вызывает аллергических реакций, обладает такими уникальными свойствами как пористость и биологическая совместимость, а также высокая влагоемкость. Бактериальная целлюлоза, в отличие от растительной, считается химически чистым внеклеточным продуктом, ведь она не содержит лигнина, восков и жиров. Ее молекулы могут образовывать микрофибриллы, которые в сто раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы, получается, что это такие структурные элементы наноуровневого размера и за счет правильного расположения волокон степень кристалличности БЦ может достигать 70 – 89 %.

Особое место в повышении выхода БЦ занимает выбор продуцента. Для культивирования используются бактерии разных родов, например, такие как - *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina* , *Sarcina* и так далее. Бактерия *Komagataeibacter xylinus* является классическим производителем этого материала.

Культивирование бактерий осуществляется на различных субстратах с разной эффективностью. Глюкоза, фруктоза, ксилоза, крахмал, мальтоза, а также глицерин могут использоваться в качестве источника углерода. Глюкоза и глицерин является лучшим субстратом для производства, поскольку обеспечивает высокую выработку БЦ до 2,4 и 3,3 г / л / сут соответственно.

Исследования бактериальной целлюлозы (БЦ), выполненные в самые последние годы, свидетельствуют о несомненных перспективах этого природного полимера для восстановительной хирургии, реконструкции дефектов кожных покровов, для клеточной и тканевой инженерии в качестве опорных носителей с возможностью депонирования и доставки лекарственных препаратов [1].

Особый интерес представляет направление, ориентированное на получение косметических масок на основе бактериальной целлюлозы. Маски для лица используются для быстрого и глубокого увлажнения, восстановления кожи и контроля кожного сала. Преимуществом БЦ по сравнению с гидрогелевыми масками являются высокие механические свойства, высокие показатели влагопоглощения для нагрузки и высвобождения активных веществ.

Цель работы – получить и исследовать пленки бактериальной целлюлозы, синтезированные *Komagataeibacter xylinus* В-12068, на различных субстратах, в качестве основы для косметических масок.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить пленки бактериальной целлюлозы в культуре штамма *Komagataeibacter xylinus* В-12068 с применением различных субстратов (глюкоза и глицерин).
2. Исследовать свойства поверхности и физико-механические характеристики полученных пленок бактериальной целлюлозы.
3. Изучить адсорбцию и десорбцию водных и масляных растворов биологически активных веществ, пленками бактериальной целлюлозы.
4. Оценить адгезивные свойства пленок бактериальной целлюлозы, в культуре клеток мышинных фибробластов линии NIH/3T3.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Природные полимеры в медицине

В последние десятилетия растет интерес к биodeградируемым природным полимерам. Альгинат, фибрин, ГК, хитозан и т.д. нашли довольно обширное использование в медицине.

Альгинат – это полисахарид, получаемый из морских водорослей и принадлежащий к семейству линейных сополимеров. При добавлении к ним двухвалентных катионов, например, кальция, альгинаты образуют нерастворимый гидрогель. За гелеобразование в альгинатах отвечают ионные взаимодействия, поэтому оно полностью обратимо при хелатировании двухвалентного катиона, используемого для получения геля. Альгинаты также используют в качестве материала для пересадки клеток различных типов. К плюсам альгинатных гидрогелей относятся не токсичность, простота в обращении, и минимальная воспалительная реакция со стороны организма. Альгинаты дают минимальный иммунный ответ, хотя в случае присутствия загрязнений и примесей возможно развитие иммунных реакций и разрастание фиброзной ткани. Как и у большинства гидрогелей, их механическая жесткость достаточна для задач, в которых не требуется приложение большой нагрузки, или для имплантации после культивирования *in vitro* и *in vivo* в течение нескольких недель, но в средах с большими напряжениями, например, в несущих нагрузку суставах их физико-механические характеристики являются недостаточными [3].

Гиалоурановая кислота – это многообещающий материал для тканевой инженерии. Представляет собой компонент межклеточного вещества мягких тканей позвоночных. ГК используется в медицине, ее применяют для заболеваний в суставной части, используются в офтальмологических операциях, но и, конечно же, в косметологии она тоже нашла достаточно популярное предназначение

Фибрин – это такой белок, который образует кровяные сгустки и участвует в тромбообразовании, а также осуществляет контролируемую доставку факторов роста. Он может быть применен в качестве тканевого адгезива в офтальмологии, для обработки ран, для лицевой и сосудистой хирургии. На начальном этапе фибрин имеет довольно-таки низкую механическую жесткость и, скорее всего, не подойдет там, где требуется большая механическая нагрузка [2].

Особый интерес привлекает такой природный полимер как хитозан. Его используют в фармацевтических и медицинских целях, так как он является биосовместимым и биоадгезивным [7].

Он похож по структуре на целлюлозу, следовательно, как и целлюлоза, он обладает волокно- и пленкообразующими свойствами. Хитозан представляет собой многообещающий носитель для реконструкции тканей. На его свойства *in vivo* непосредственно влияет химический состав. При повышении степени деацетилирования хитозана, время его пребывания *in vivo* увеличивается, а вызываемая им воспалительная реакция ослабевает. Будучи поликатионом, хитозан естественным образом адгезирует к биологическим тканям, имеющим, как правило, отрицательный заряд на поверхности. Это может служить объяснением того, что хитозан задерживался в месте суставного повреждения, несмотря на подвижность незафиксированного сустава и недостаточную начальную жесткость хитозана. [60]. Кроме того, препараты хитозана не содержат потенциально токсичных сшивающих агентов или остатков органических растворителей, что определяет отсутствие цитотоксичности для несомых клеток или организма хозяина. Он обладает антибактериальным, антитоксическим и противовирусным действием [9].

Активно изучаемые в настоящее время линейные полиэфиры полигидроксиалканоаты (ПГА) – это биodeградируемые и биосовместимые полимеры, являющиеся источником микробов, также перспективны для обширного использования в медицине. ПГА применяются в медицине,

например, в кардиологии, ортопедии, стоматологии и так далее. Перспективой считается использование ПГА в тканевой и клеточной трансплантологии для реконструктивной хирургии тканей, создании биоискусственных органов [34].

Коллаген – самый широко распространенный белок в организме, и в основном играют структурную роль. Коллаген может быть приготовлен в виде раствора или сформирован в нити, губки или гидрогели [4]. Несмотря на то, что его получают из чужеродных источников, использование методов очистки позволяет практически полностью избежать иммунного ответа. Прикрепление клеток к коллагену происходит за счет белков интегринов, узнающих определенный мотив Arg-Gly-Asp (RGD) последовательность. Прикрепление к этому естественному субстрату и связанные с ним сигналы внутри клетки приводят к улучшению метаболизма клетки, пролиферации, сохранению жизнеспособности и дифференцированного состояния. Бесклеточные матрицы получают путем комбинированной ферментативной и детергентной обработки тканей, богатых коллагеном, таких как сердечные клапаны свиньи или подслизистой тонкого кишечника [5]. Обработка убирает все клетки и потенциально антигенные белки, остается только коллаген и эластин с небольшим количеством ассоциированных полисахаридов ВКМ. У гелей на основе коллагена недостаточность механической прочности и короткие сроки биodeградации можно компенсировать за счет сшивок, например, при помощи глутарового альдегида [6].

Протеогликаны – сложные макромолекулы, каждая из которых состоит из сердцевинного белка с одним или несколькими ковалентно присоединенными линейными полисахаридными цепями, называемыми глюкозаминогликанами (ГАГ). Протеогликаны, например, гиалуроновая кислота (ГК), встречаются, как в клетке, так и на ее поверхности. Эти молекулы способны ассоциировать между собой, образуя запутанные сетки, удерживающие большое количество воды, обладающие упругостью и в то же время легко деформируемые. Благодаря своим упругим свойствам, протеогликаны организуют пространство,



в котором клетки могут двигаться, проходить дифференцировку, а также создавать новый матрикс [35].

Способы получения биоактивных имплантатов включают в себя производство биосовместимых и биоабсорбированных органов структуры (инкубаторы) для культивирования аутологичных клеток, а также растущие клетки и формирование тканей в пробирке и последующей имплантации полученных помогите пациенту [36].

Использование таких биоконструкций, независимо от того, нагружены они или нет лекарственными препаратами, например, антибиотиками, витаминами, гормонами, революционным направлением в реконструктивной и прецизионной хирургии и в трансплантологии – это большая перспектива[37].

Среди природных полимеров бактериальная целлюлоза вызывает особый интерес в последнее время.

## **1.2. Синтез и свойства бактериальной целлюлозы**

Целлюлоза – широко распространенный в природе углеводный биополимер, имеющий преимущественно растительное происхождение. Однако в последнее время вырос интерес к целлюлозе, продуцируемой различными клетками микроорганизмов, преимущественно бактерий, в связи, с чем биополимер получил название – бактериальная целлюлоза (БЦ). БЦ представляет собой химически чистый  $\beta$ -глюкан, состоящий из  $\beta$ -1,4-глюкопиранозальных единиц, который. В отличие от растительной целлюлозы, бактериальная является химически чистой, так как не содержит лигнина, смол и восков.

Нановолокна бактериальной целлюлозы (БЦ) уникальны, это природный органический материал, в одно и то же время прочный и эластичный.

Макромолекула целлюлозы состоит из тысяч остатков глюкозы, которые соединены в спирально закрученную цепь. 20–200 цепей образуют кристаллический пучок или микрофибриллу. Микрофибриллы собираются в

лентовидные волокна, погруженные в толщу цементирующих полимеров — ксиланов, лигнинов, арабинанов, белков и пектинов. Оказывается, что материал является не только прочным, но и также водонепроницаемым.

Структура БЦ обеспечивает уникальные физические и механические свойства этого высокомолекулярного биополимера: высокая пористость с наноразмерными порами, высокая механическая прочность наряду с эластичностью, высокая сорбционная способность и степень кристалличности, которая может достигать 90%, что позволяет использовать БЦ для сотворения всевозможных современных композиционных материалов разного предназначения. Также, БЦ имеет отличные свойства, такие как прозрачность, прочность на растяжение, адаптивность к живому. Кроме того, БЦ привлекательна тем, что представляет собой уникальный нетоксичный, биологически совместимый материал и не вызывает аллергическую реакцию, а также является биodeградируемым полимером.

БЦ характеризуется высокой проницаемостью для жидкостей и газов и обладает высокой способностью поглощения воды (до 1000% от своей сухой массы) [3]. Свойства БЦ могут быть легко изменены с помощью различных методов, таких как добавление различных веществ в среду в процессе культивирования клеток, изменение самих условий культивирования (перемешивание среды, аэрация, варьирование температурных условий, pH среды), физическая и химическая модификация, специальные условия сушки и электромагнитное воздействие [13].

Биосинтез целлюлозы включает промежуточные реакции, которые требуются для осуществления индивидуальных ферментов для осуществления которых требуются индивидуальные ферменты, каталитические комплексы и регуляторные белки. Производство бактериальной целлюлозы и продуктивность бактерий, конечно же, зависят от таких условий культивирования - состав питательной среды, содержание растворенного кислорода и условия культивирования [14].

Выбор питательных сред и условий для культивирования очень важен и для роста бактерий, которые образуют БЦ, ведь рост бактерий влияет на стимулирование продуцирования БЦ. Наиболее важным фактором, который влияет на продуктивность и скорость синтеза БЦ – это источник углерода, который используется для культивирования целлюлозосинтезирующих бактерий. Наиболее подходящим источником углерода для получения БЦ является глюкоза, хотя и другие углеводы, такие как фруктоза, сахароза, мальтоза, ксилоза, крахмал, а также глицерин и многоатомные спирты (арабит и маннит) могут использоваться бактериальными продуцентами для синтеза этого полисахарида. Широкий диапазон утилизируемых источников углерода для синтеза БЦ позволяет использовать в качестве сырья разнообразные углеводсодержащие отходы пищевой промышленности и агропромышленного комплекса. Наличие в таком сырье дополнительных микро- и макронутриентов положительно влияет на биосинтез БЦ, однако в ряде случаев исходное сырье содержит ионы тяжелых металлов, различные ксенобиотики, например, пестициды, что негативно воздействует на клетки. В этом случае требуется их значительная стабилизация [15].

Получение БЦ – сложный и длительный процесс. Особое место в повышении выхода БЦ занимает выбор продуцента. Микробиологическую целлюлозу способны синтезировать бактерии различных родов (*Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* и *Mycodema*), но классическим производителем этого материала считается бактерия *Komagataeibacter xylinus* [16].

*Komagataeibacter* – род бактерий из семейства *Acetobacteraceae* класса *Proteobacteria*, характеризующийся умением окислять этанол до уксусной кислоты. *Komagataeibacter xylinus* является одним из видов бактерии, которая производит большое количество целлюлозы. Это граммотрицательная, строго аэробная палочковидная бактерия. Клетки эллипсоидных до палочковидных, прямые или слегка изогнутые, размером 0,4-0,6\*1,0-1,6 мкм. Клетки

подвижные или неподвижные. Эндоспор не образуют. Оптимальная температура +28...+30 °С. Оптимальный диапазон рН 3,5-4,5 [38].

Когда этот вид выращивают в лаборатории при статических условиях, то формы целлюлозы получаются как толстый коврик. Микрофибриллы бактериальной целлюлозы синтезируются под поверхностью клетки *Komagataeibacter xylinus*. БЦ содержит наборы параллельных цепей, состоящих из β-D-глюкопиранозных единиц, связанных между собой межмолекулярными водородными связями, которая идентична по химическому составу растительной целлюлозе. Толщина гель-пленки может достигать до 2,5 см за месяц. Ее молекулы лежат строго параллельно друг другу. Поэтому образующиеся кристаллические микрофибриллы в 100 раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы, то есть это структурные элементы наноразмерного размера [17]. Они собираются в лентовидные волокна, которые погружены в толщу полимера, тем самым формируя в зависимости от условий культивирования слизистые пленки (статические условия) или отдельные сгустки (культивирование с перемешиванием).

Гель-пленка БЦ хорошо пропускает жидкость, поддерживает баланс влажности, она безболезненно наносится, активно насыщая лекарственными препаратами. Она считается физическим барьером для инфекций [18].

Процесс получения БЦ длительный, поскольку продуценты являются анаэробными клетками (*Achromobacter*), и сложный. Изучение влияния различных условий культивирования продуцентов на синтез ими БЦ проводится для повышения ее выхода. Основные параметры, которые влияют на рост целлюлозосинтезирующих бактерий и образование БЦ – это аэрация среды, концентрация источника углерода, температура культивирования, также состав питательной среды и наличие ее перемешивания. Реакция микроорганизмов на эти факторы объясняется тем, что явления индукции и репрессии синтеза ферментов, в результате которых изменяется морфология клеток и их биосинтетическая способность. Для каждого продуцента и

конкретного штамма необходимо обязательно уточнять технологические параметры, при этом главным из них является температура [19].

Для синтеза бактериальной целлюлозы используются различные субстраты. В качестве источников витаминов используют дрожжевой экстракт, а в качестве восполнителя дефицита азота состав должен содержать пептон, а для ускорения биосинтеза БЦ применяют этанол [20].

При этом в условиях перемешивания форма бактериальной целлюлозы будет иной, чем при статических условиях. В условиях перемешивания образцы БЦ будут иметь неправильную нитевидную, овальную, пальцеобразную и шарообразную форму. Они будут представлять собой объемные элементы, внутри которых собирается и накапливается культуральная жидкость. Тонкие плоские пленки БЦ будут получены в статических условиях [21].

### **1.3. Применение бактериальной целлюлозы**

#### **1.3.1. Применение БЦ в пищевой промышленности**

БЦ издавна употребляют в пищу в странах Юго-Восточной Азии на островах Тихого океана, где она является основным компонентом популярного десерта Ната-де-Коко и Ната-де-Пина [22]. Сегодня в пищевой промышленности в ряде стран БЦ уже широко используется для приготовления различных пищевых продуктов, в частности, молочных десертов, пудингов, желе, конфет. БЦ используется в основном как наполнитель, загуститель, стабилизатор, желеобразователь и влагоудерживающий агент или для придания продуктам волокнистой структуры. [23]

Добавление БЦ в шоколадный напиток предотвращает осаждение частиц какао. Вязкость продукта остается неизменной даже после термической стерилизации. Кроме того, пищевые продукты, имеющие в своем составе БЦ, сохраняют свою влажность в течение 1 месяца. Мороженое с БЦ сохраняет форму в течение 1 ч после извлечения из морозилки [40].

БЦ применяется в качестве пищевой добавки (грубые волокна) и рекомендуется для снижения риска таких хронических заболеваний, как диабет, ожирение, сердечно-сосудистые [24].

БЦ также используется при изготовлении упаковочных материалов для пищевых продуктов. Упаковочный материал должен увеличивает срок годности при хранении и безопасность продуктов. Использование энтерифицированной БЦ при производстве упаковки показало, что полученный материал характеризуется высокой степенью защиты по отношению к различным газам и водяному пару [41].

### **1.3.2. Применение БЦ в медицине**

Исследование свойств бактериальной целлюлозы в медицине ведется по множеству направленностей: от раневых покрытий, лечение ожогов до имплантаций, дефектов хрящей и т.д [42].

Так, например, благодаря своей высокой степени чистоты, гидрофильности, биосовместимости, высокой прочности и проницаемости для жидкостей и газов БЦ находит все большее применение в создании искусственной кожи [25]. Препараты на основе БЦ были успешно использованы в более чем 300 различных процедурах, в частности, в лечении ожогов II и III степени, а также различных язв. Оказалось, что БЦ играет важную роль в стимулировании регенеративных процессов, помогая восстановлению базальной мембраны и ускоряя эпителизацию и рубцеванию ран [26]. Смочив физиологическим раствором такую, то она приобретет такие свойства как прозрачность, эластичность и плотность, схожие с человеческой кожей. Благодаря таким свойствам гель-пленка микробной целлюлозы может служить матрицей-носителем абсолютно для любых лекарств [27].

В предварительных исследованиях на животных было показано, что трубчатые гелевые пленки с бактериальной целлюлозой могут быть использованы для микрохирургического протезирования кровеносных сосудов

с внутренним диаметром до 1 мм, а также протезирования нисходящей аорты и яремной вены. Немецкий материал получил название - Бейсик. Он обладает такими характеристиками, как высокая механическая прочность, гибкость и, конечно же, биосовместимость. Важно знать, что кровеносные сосуды не закупориваются тромбами. Искусственная часть сосуда постепенно замещается частью за счет миграции эндотелиальных клеток, фибробластов и миоцитов [20].

Вследствие открытия биоцеллюлозы, появилась возможность создания абсолютно натуральной матрицы, способной быть носителем практически любых лекарственных препаратов, что широко используется в медицине и фармацевтике. Использование природных полимеров для доставки лекарств является активной областью исследований, потому что они легко доступны, относительно недорогие, потенциально способны к разложению и биосовместимые. Использование пленкообразующих материалов в качестве средств для лекарственных препаратов, специализированных покрытий на лекарства или их упаковки [21].

БЦ может быть использована в качестве искусственного хряща, прекурсора костной ткани и как универсальное покрытие при разных видах травм. Получившиеся коллагеновые каркасы достаточно биологически активны и подходят для клеточной адгезии, вследствие этого они могут быть использованы в качестве искусственной ткани или, например, для создания раневых повязок [23].

Также, БЦ является одним из потенциальных материалов для изготовления контактных линз из-за своей прозрачности, коэффициента пропускания света и проницаемости для жидкостей и газов. Так, были сформулированы контактные линзы при использовании вязких растворов БЦ, полученных в результате растворения полимера в ионной жидкости 1-бутил-3-метилимидазолия хлориде. Такие линзы сохраняли свою форму и прозрачность в течение 8 недель.

Был получен гидрогель путем объединения БЦ и 2-гидроксиэтилметакрилата, который характеризовался высоким содержанием воды (40 вес.%), высокой механической прочностью и целостностью и был использован в качестве контактных линз. Кроме того, способность БЦ окрашиваться в цвет среды может быть использованы для получения цветных контактных линз [32].

БЦ используется в основном как медицинский материал. Из геля – пленки бактериальной целлюлозы (ГПБЦ) делают протезы кровеносных сосудов, могут регенерировать костную ткань и хрящ, а восстанавливать кожный покров [5].

### **1.3.3. Применение БЦ в косметической промышленности**

Бактериальная целлюлоза – не аллергенный биополимер [43]. В связи с этим применение БЦ в составе косметических средств весьма актуально, поскольку она не токсична. БЦ применяется в составе косметических средств в качестве стабилизатора при изготовлении водно-жировых эмульсий без добавления каких-либо поверхностных активных веществ. Подобные препараты на основе БЦ не вызывают раздражения чувствительной кожи [28].

Порошкообразная БЦ используется в приготовлении скрабов для лица, которые характеризуются безопасностью для кожи, имеют лучшую вязкость и отшелушивающий эффект. Добавление БЦ в состав косметических средств не только улучшает трансдермальное проникновение активных ингредиентов, присутствующих в косметике, но увеличивают увлажнение кожи, поглощение кожного сала и отшелушивание кожи [31]. Благодаря высокой удерживающей способности воды и хорошей газовой проницаемости БЦ является удачным носителем для таких ингредиентов косметических продуктов, как салициловая кислота, гиалоурановая кислота, различных полипептидов, факторов роста, ферментов и их комбинаций.

Маски для лица на основе бактериальной целлюлозы представляют большой интерес в качестве косметических средств для лечения кожи,



благодаря своей биоразлагаемости, низкой токсичности и способности увлажнять кожу.

В работе Thanaporn Amnuikit исследовали бактериальную целлюлозу в качестве макси для лица. В исследовании приняли участие тридцать здоровых тайских добровольцев в возрасте 21–40 лет. Добровольцы были случайным образом разделены на контрольную группу и экспериментальную группу. Для контрольной группы добровольцам было назначено наносить влажные полотенца на лицо в течение 25 минут. Для экспериментальной группы добровольцам было назначено применять маски на основе БЦ, то есть полупрозрачные пятна, которые можно было нанести на лицо в течение того же периода. Через неделю группы были переведены на альтернативное лечение. Уровни влажности кожи, кожного сала, эластичности, текстуры, матовости и шелушения были оценены с использованием системы, используемой для кожи перед применением пробного продукта и через пять минут после его удаления. По результатам маска на основе БЦ значительно повысила уровень влажности в коже по сравнению с влажными полотенцами ( $P < 0,05$ ) после однократного применения. Это говорит о том, что применение масок на основе БЦ улучшает поглощение влаги кожей лица [33].

Аналогично и в работе Isabelle Almeida оценивали увлажняющую способность БЦ с глицерином и без него. В этом исследовании приняли участие пятнадцать здоровых взрослых людей (12 женщин и 3 мужчины). Образцы БЦ наносили на внутреннее предплечье на 24 часа. Автор утверждает, что добавление глицерина привело к значительно более высокому эффекту увлажнения кожи, что доказывает его потенциал использования в маски для лица. Это говорит о том, что БЦ с глицерином может быть клинически значима для лечения кожных заболеваний, характеризующихся сухостью, таких как псориаз и дерматит [34].

В патенте Chang Keun Lee исследовали бактериальную целлюлозу, пропитанную экстрактом женьшеня. Испытания проводили на женщинах

старше 30 лет. Таким образом, было обнаружено существенное увеличение эластичности кожи, включая антивозрастное, антиоксидантное и противовоспалительное действие в клетках кожи [28].

#### **1.4. Компоненты для косметических масок**

Погоня за красотой приводит косметику на растущий рынок и растущее разнообразие продуктов. Вещества, отвечающие за улучшение красоты, косметические активные вещества, включены в наполнители, которые транспортируют их к коже, способствуя проникновению. Для изготовления косметических масок используют разнообразные добавки:

Растительные масла, которые являются основными компонентами жировой основы косметических кремов - касторовые, абрикосовые, сливовые, оливковые, кукурузные, соевые, миндальные [35]. В центре внимания оказываются и эфирные масла с успокаивающим действием. А именно, масло розы используют в косметологии для омолаживания, так как оно способствует торможению процессов старения кожи [16], избавлению от морщин и в то же время повышает упругость кожи и эластичность, рассасыванию рубцов, шрамов и нормализует деятельность сальных желёз [35].

Эмульгаторы применяют для образования стойких эмульсий из двух не смешивающихся между собой жидкостей, например, масла и воды. Многие косметические средства представляют собой эмульсии, для стабилизации которых применяют эмульгаторы такие как:

1. Гидроколлоиды растительного и животного происхождения, например, агар, пектин, желатин, хитозан, ланолин, холестерин, лецитин.

2. Поверхностно-активные вещества: катионные, анионные, амфотерные, неионогенные.

3. Синтетические и полусинтетические полимеры - карбопол, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и т.д.

Каротиноиды обладают такими свойствами как антиоксидантное и репаративное действие, применяют, чтобы устранить сухость и шелушение кожи, защитить ее от вредного воздействия ультрафиолетового излучения. Широко используется в косметических средствах, антибактериальных средствах и дезодорирующих свойствах препараты хлорофилла. Биостимулирующим действием обладают хиноны, каротин, антибиотики, витамины и многие микроэлементы, которые имеют биологическую активность, участвующие в физиологических процессах [36].

Моносахариды, особенно сахара, также используются для нескольких целей. Например, текстильные маски - в них используются биологически активные вещества, которые вводятся в гелевый слой маски и которые запускают свои действия, когда нанесете маску на кожу. Косметологи давно уже используют сахар в своей работе. Мастера предлагают своим клиентам сахарные процедуры, они назначают их для улучшения внешнего вида, стремятся очистить и освежить кожу. Сахара оказывают стимулирующее действие на капилляры верхних слоев кожи, они ускоряют обмен веществ, предотвращают старение кожи и делают ее более эластичной. Кроме того, сахар является естественным источником моносахарида рамнозы [37].

Альгинат натрия – это такой полисахарид, который укрепляет клеточные стенки. Альгиновая кислота обладает рядом известных полезных свойств. Альгинат, который содержит много полезных микроэлементов, хорошо питает кожу, увлажняет ее, проникает глубоко в кожу из текстильных компрессов, также придает коже прекрасный лифтинг-эффект, оказывает, антиоксидантное и регенерирующее действие, а также регенерирует новые клетки. Альгиновая кислота может, адсорбировать воду, которая весит почти в 300 раз больше собственного веса [36].

К смешанной группе химических веществ, относятся витамины, которые все встречаются в природе. В отличие от большинства других косметических ингредиентов, они являются незаменимыми питательными веществами,

играющими ключевую роль в метаболизме всех органов человека, включая самый большой орган человека-кожу. Кожа часто является первым показателем дефицита в пище одного или нескольких витаминов. Лабораторные и клинические исследования показали благотворное воздействие на кожу некоторых из 13 витаминов при местном применении. Это научное доказательство является основой для инкорпорации этой группы веществ во все виды косметических средств. Наиболее широко используемые витамины в косметике и косметических средствах - это витамин А, витамин С и пантенол (провитамин В5). Витамин Е и витамин С являются антиоксидантами. Они нейтрализуют нестабильные молекулы кислорода, свободные радикалы, тем самым предотвращая повреждение кожи этими высокореактивными веществами. Витамин А доказал свою эффективность в предотвращении, замедлении и восстановлении изменений, связанных с процессом старения, таких как сухость, шелушение кожи и образование морщин. Пантенол используется в продуктах для ухода за кожей, волосами, губами и ногтями, главным образом для ее увлажнения. И кроме того, пантенол обладает ранозаживляющими и противовоспалительными свойствами. Несмотря на то, что эти свойства не являются космическими, они являются желанными побочными эффектами, в частности, когда косметика наносится на слегка поврежденную кожу [39].

## **2. Материалы и методы исследования**

### **2.1. Получение бактериальной целлюлозы**

Бактериальные целлюлозные пленки синтезировали в культуре *Komagataeibacter xylinus* В-12068 двумя способами: на чашках Петри и в металлическом лотке. Пленки выращивали на двух видах источника углерода – глюкозе и глицерине, далее сравнивали их физико-механические характеристики, свойство поверхности и влагопоглощение.

Штамм продуцент БЦ выращивали на питательной среде *Hestrina-Schramm* (HS). Стандартная питательная среда состоит из (г/л): глюкозы – 20, пептона – 5, дрожжевого экстракта – 5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 2,7, лимонной кислоты – 1,15. Так же в приготовленные среды добавляли этанол 3% и уксусную кислоту (70%) – 0,2 мл на 100 мл среды. Для приготовления пленки БЦ на субстрате с применением глицерина, вместо глюкозы, как источника углерода в среду добавляли глицерин 5мл/л.

Бактерии выращивали на жидких питательных средах HS. Для этого брали две колбы 1000 мл, добавляли в них по 500 мл жидкой среды, автоклавировали при 115°C 25 мин., далее разливали по чашкам Петри (по 20 мл.) и в металлический поднос (1 л). Затем сеяли культуру бактерий со скошенного агара и культивировали в течение 7 дней при температуре 30°C в термостате. Полученные пленки БЦ отделяли от культуральной жидкости. Для чистки пленки помещали в 0,5% раствор NaOH на 24 часа. После промывки в дистиллированной воде пленки помещали в 0,5% раствор уксусной кислоты на 24 часа для нейтрализации, после чего промывали дистиллированной водой (Рис.1.). Далее пленки высушивали двумя способами: на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы и второй способ – лиофильная сушка (ALPHA 1-2 / LD (Martin Christ GmbH, Германия)).

Массу полученных пленок измеряли на лабораторных весах *Adventurer OH-AR2140* (Ohaus, Швейцария)

Выход продукта (Y) (экономический коэффициент) определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X/S_0 - S \quad (2),$$

где S и S<sub>0</sub> – конечная и исходная концентрация субстрата.



Рисунок 1 – Промывка пленок БЦ, полученных в культуре уксуснокислых бактерий *Komagataeibacter xylinus* B-12068

## 2.2. Исследование свойств пленок БЦ

Поверхностная микроструктура пленок БЦ была проанализирована с помощью сканирующей электронной микроскопии (S 5500, Hitachi, Japan). Перед анализом пленки лиофилизировали в сушилке ALPHA 1-2 / LD (Martin Christ GmbH, Германия) в течение 24 часов. Образцы (5 × 5 мм) помещали на предметный столик и покрывали напылением из платины с использованием распылителя Emitech K575X (10 мА, 2 × 40 с). Диаметры волокон измерялись путем анализа изображений SEM с помощью программы анализа изображений и анализ данных в Java (ImageJ).

Краевой угол смачивания водой пленок БЦ измеряли с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (KRUSS, Германия) (Рис.2), с использованием программного обеспечения DSA – 4 для Windows.

Из пленочных образцов вырезали полоску (1x7 см) и поочередно наносили капли воды и дийодметана объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия каждой жидкости с поверхностью образца.



Рисунок 2 – Прибор KRUSS (Германия)

Физико-механические свойства БЦ пленок исследовали с помощью электромеханической испытательной машины INSTRON 5565 (Великобритания) (Рис.3.). Полученные пленки БЦ нарезали на полоски в виде образцов прямоугольной формы длиной 60 мм и шириной 10 мм.



Рисунок 3 – Прибор INSTRON 5565(США)

Толщину пленок измеряли с помощью электронного цифрового микрометра LEGIONER EDM-25-0.001 (Legioner, Китай). Модуль Юнга (Мпа), предел прочности (Мпа) и удлинение при разрыве были рассчитаны с использованием программного обеспечения Bluehill 2 (Instron, Франция).

### **2.3. Исследование свойств адсорбции и десорбции пленок БЦ**

#### *Адсорбционные свойства пленок БЦ*

Из пленок БЦ вырезали диски диаметром 1,5 см, взвешивали и помещали в адсорбат (вода и масло чайного дерева) на 5 ч и 24 часа соответственно, затем, по окончании выдержки, пленки БЦ вынимали, промокали с помощью фильтровальной бумаги и затем снова взвешивали.

Количество адсорбата вычисляли как разность масс пропитанной пленки БЦ и носителя до адсорбата. В качестве результата измерения принимали среднее арифметическое 10 параллельных измерений.

#### *Десорбционные свойства пленок БЦ*

Далее полученные образцы подвергли десорбции, которую проводили следующим образом: образцы помещали в буферные растворы с рН 2.0, 3.5, 6.0, 7.2, 8.0 с соотношением твердой и жидкой фаз, равным 1:50, при



температуре 35-40°C. Растворы с рН 2.0 и 3.5 готовили с использованием глицинового буфера, растворы с 7.2 и 8.0 – фосфатного буфера, в качестве раствора с рН 6.0 использовали дистиллированную воду. Подготовленные образцы помещались в емкость с буферным раствором, по окончании выдержки вынимали и помещали на 20 минут на пористую пластину, затем высушивали до постоянной массы. После высушивания рассчитывали количество десорбированного вещества как разность масс пропитанной пленки БЦ и образца после десорбции. В качестве результата измерения принимали среднее арифметическое 10 параллельных измерений.

#### **2.4. Исследование способности БЦ поддерживать рост и адгезию клеток**

На полученные матриксы БЦ, в асептических условиях, были рассеяны клетки (фибробласты мыши линии NIH 3T3) с добавлением полной питательной среды. На каждую лунку высевали клетки плотностью  $1 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup> и добавляли 1 мл питательной среды. Замена среды производилась на третьи сутки. Перед посевом, клетки были отделены от культурального флакона с помощью обработки раствором трипсина (3 мл) в течение 5 минут. Затем добавляли питательную среду (3 мл), чтобы нейтрализовать трипсин. Суспензию клеток центрифугировали (3000 об/мин, 5 мин) и клеточный осадок ресуспендировали в среде (1 мл). Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра по формуле:

$$X = N \cdot 0,05 \cdot 10^6 \cdot m$$

где: X – концентрация клеток в одном мл (млн/мл), N – количество клеток в 5 больших квадратах, m – разбавление.

#### **2.5 Оценка жизнеспособности фибробластов**

Жизнеспособность клеток на полимерных матриксах изучали в реакции с МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом], которая

основывается на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана, это характеризует активность митохондрий живых клеток и косвенно отражает количество жизнеспособных клеток и способных к пролиферации. Оценивали 1 и 3 сутки. После 24-х часов культивирования меняли среду, добавляли новую 950 мкл и 50 мкл МТТ. Затем убрали планшет в инкубатор на 4 часа. По истечению времени доставали планшет, убрали среду досуха, затем добавляли 150 мкл ДМСО. После чего переносили содержимое по 100 мкл в девяностошестиуночный планшет и измеряли оптическую плотность на фотометре при длине волны 550 нм. Такие же измерения производили на третьей сутки. Каждый образец имел три повторности. Количество клеток рассчитывали по калибровочному графику.

## **2.6. Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI**

Флуоресцентное окрашивание клеток на матриксах проводили красителем DAPI (ядерный маркер). После удаления питательной среды клетки промыли фосфатно-буферным раствором, фиксировали 4% раствором формалина в течение одного часа, затем снова промыли фосфатно-буферным раствором, обработали раствором Triton-X в фосфатно-буферном растворе (1 % по объему) в течение 5 минут, далее опять промыли фосфатно-буферным раствором. После этого клетки окрасили DAPI (концентрация рабочего раствора 1 мкг/мл, по 50 мкл раствора на образец) в течение 15 минут. Затем каждый образец тщательно промыли фосфатно-буферным раствором. И результаты окрашивания наблюдали в флуоресцентный микроскоп.

## **2.7. Статистический анализ данных**

Статистический анализ был выполнен с помощью программ Microsoft Excel. Результаты представлены как среднее арифметическое со стандартными

отклонениями. Достоверность отличия средних проверяли с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости  $p = 0,05$ .

### 3. Результаты и обсуждения исследований

#### 3.1. Получение пленок бактериальной целлюлозы

Проведен сравнительный анализ образования бактериальной целлюлозы при культивировании штамма *Komagataeibacter xylinus* в поверхностных условиях на питательной среде NS с глюкозой и глицерином в качестве источника углерода. Через 7 суток культивирования сырая масса пленок, выращенных на питательной среде с глюкозой, в среднем составила  $50,04 \pm 5,66$  г/л, а масса пленок, выращенных на субстрате с глицерином  $59,43 \pm 3,23$  г/л (Рис.4.). Сухая масса пленки с глюкозой составила  $0,350 \pm 0,02$  г/л, с глицерином  $0,460 \pm 0,07$  г/л (Рис.5.).

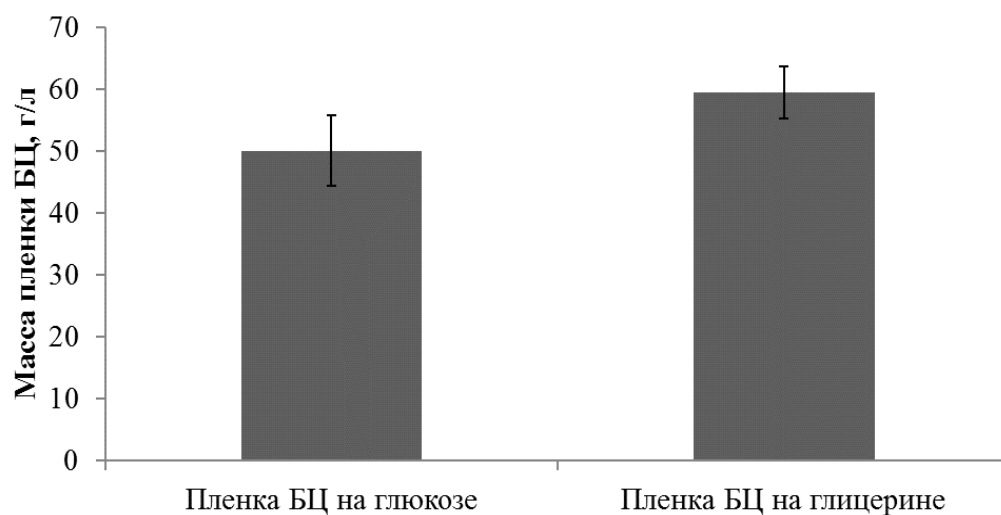


Рисунок 4 – Масса сырых пленок БЦ

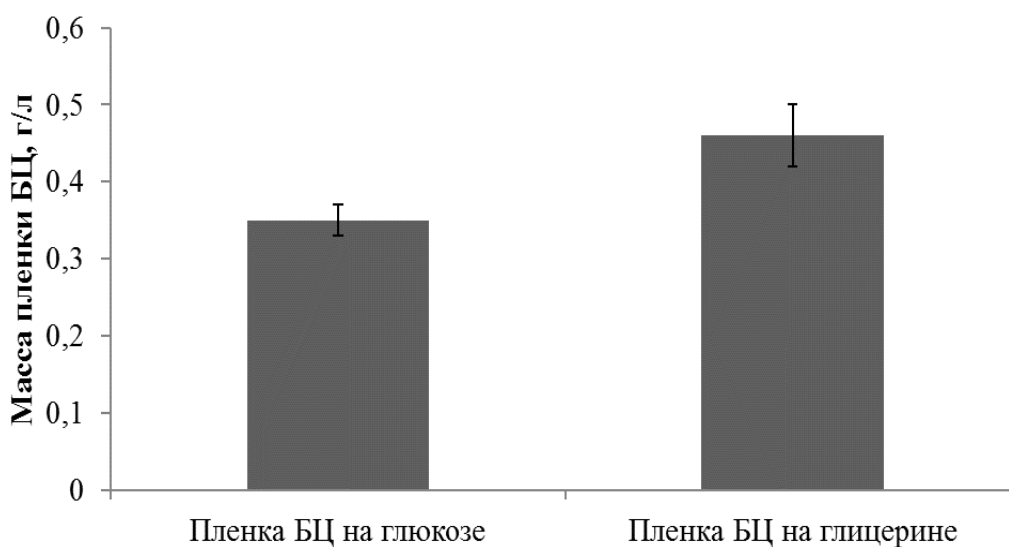


Рисунок 5 – Масса сухих пленок БЦ

Экономический коэффициент процесса составил 2,5 г сырой БЦ или 0,02г сухой БЦ на 1 г глюкозы, 11,8 г сырой БЦ или 0,09 сухой БЦ на 1мл глицерина. Таким образом, урожайность выращивания пленок БЦ на глицерине выше на 29,31 % сырая масса и на 18,7% сухая масса, по сравнению с урожайностью пленок БЦ выращенных с использованием глюкозы.

### 3.2. Характеристики пленок БЦ

Сырые пленки БЦ на глюкозе и глицерине диаметром 9 см визуально не отличались. Пленки были прозрачными, имели неровную поверхность с изгибами и заломами. (Рис. 6).

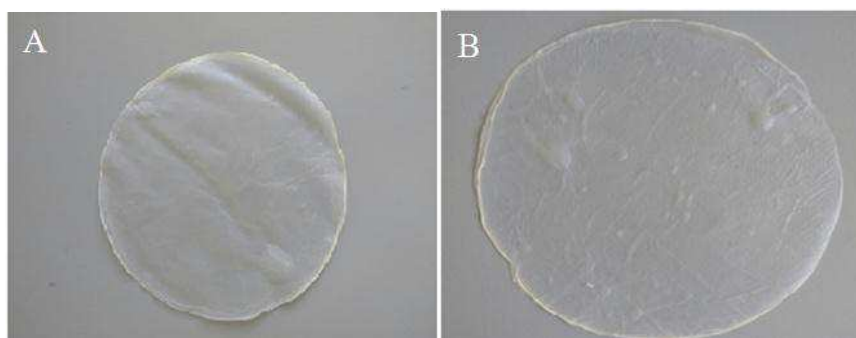


Рисунок 6 — Внешний вид пленок после отмывки в дистиллированной воде: А-пленка на глюкозе, Б-пленка на глицерине

Сначала пленки промывали дистиллированной водой, далее их высушивали при комнатной температуре и с помощью лиофильной сушилки (ALPHA 1-2 / LD (Martin Christ GmbH, Германия) (Рис. 7).

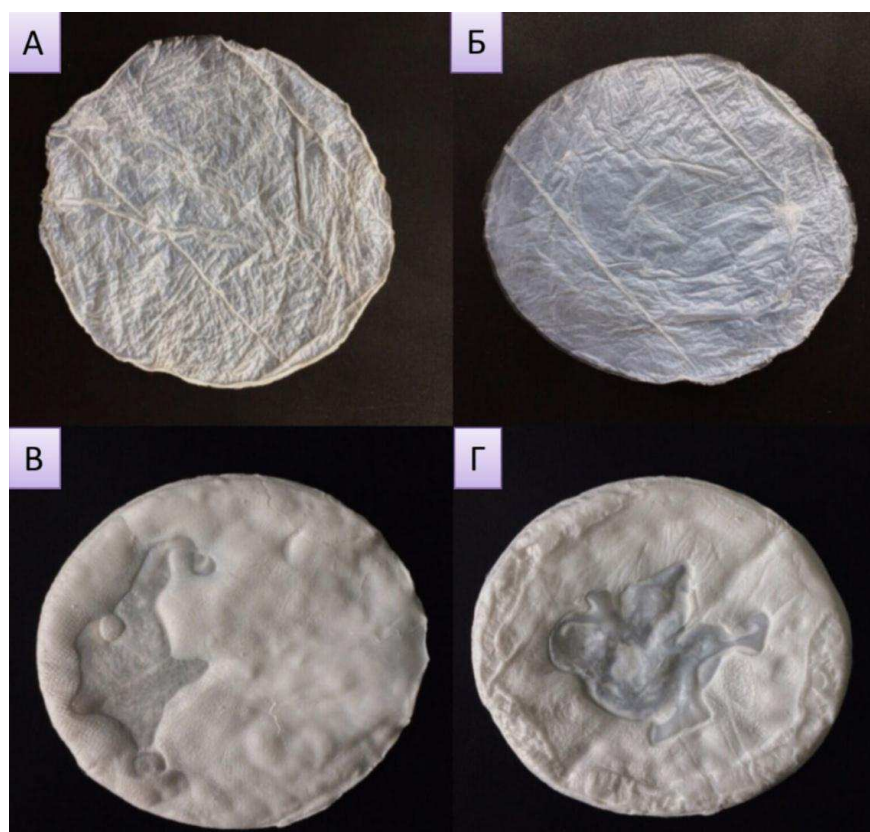


Рисунок 7 – Пленки БЦ высушенные при комнатной температуре БЦ: А – полученные на глюкозе, Б – полученные на глицерине и высушенные при лиофилизации: В- полученные на глюкозе, Г – полученные на глицерине

Высушенные при комнатной температуре пленки БЦ обладали характерными складками, соответствующими расположению микрофибрилл и отличались от лиофильно-высушенных пленок, обладающих трехмерной структурой. Толщина пленок, высушенных при комнатной температуре на глюкозе, составила 69,1 мкм, пленок БЦ на глицерине 35,3 мкм.

### 3.3. Электронная микроскопия

По данным электронной микроскопии поверхность пленки на глюкозе была представлена многочисленными сплетениями волокон диаметром от  $52 \pm 10,5$  нм до  $177 \pm 2,0$  нм, которые достоверно не отличалась от волокон пленок на глицерине  $54 \pm 9$  нм до  $180 \pm 3$  нм (Рис.8.).

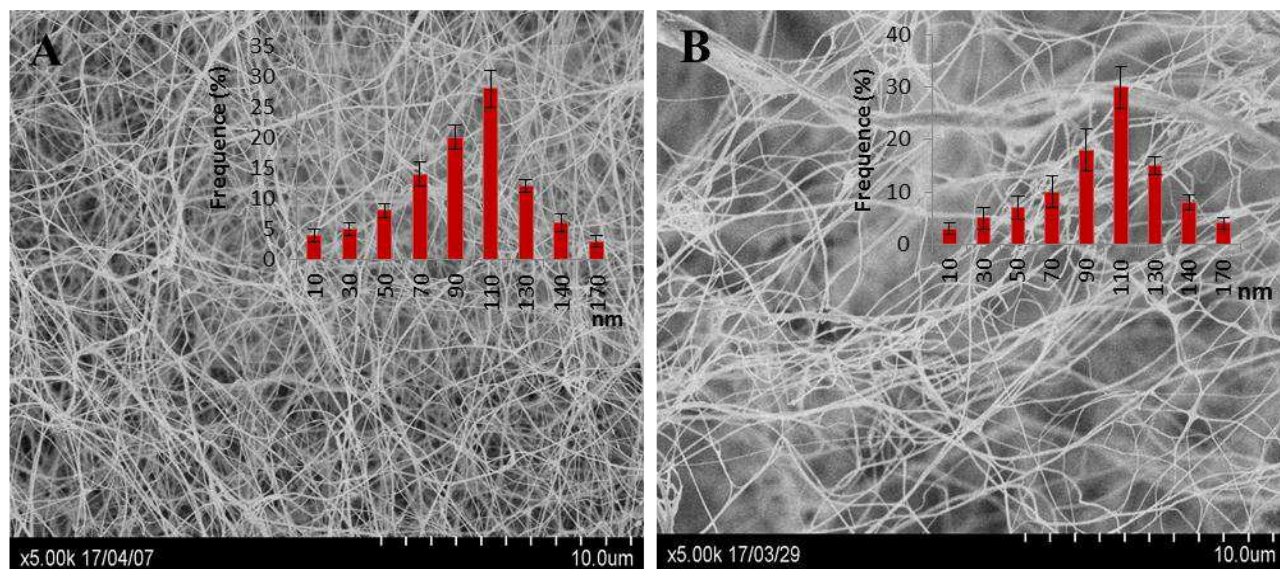


Рисунок 8 – Микрофотографии пленок БЦ: А, Б – пленки, синтезированные на глюкозе, В, Г – пленки, синтезированные на глицерине

Способ высушивания не влиял на диаметр волокон. На примере пленок, выращенных на глицерине, установлено, что минимальный и максимальный диаметр волокон составил 52 нм и 173 нм, соответственно. Однако в лиофилизированных пленках фибриллы располагались более свободно, и расстояние между ними было в 2,5-3,0 раза больше, чем в пленках, высушенных при комнатной температуре, достигая примерно 1,6 мкм.

### 3.4. Свойства поверхности пленок БЦ

Результаты исследования свойств поверхности пленок представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Свойство поверхности пленок БЦ

Образец	Краевой угол, град	Поверхностная энергия, МН/м	Дисперсная составляющая, МН/м	Полярная составляющая, МН/м
Пленки БЦ (на глюкозе)	$37,8 \pm 5,51$	$65,5 \pm 1,56$	$40,4 \pm 0,78$	$25,1 \pm 0,78$
Пленки БЦ (на глицерине)	$39,5 \pm 4,46$	$65,5 \pm 2,55$	$39,4 \pm 1,5$	$25,6 \pm 1,06$

По данным измерений контактного краевого угла смачивания водой доказано, что поверхность полученных пленок БЦ как на глюкозе, так и глицерине является достаточно гидрофильной. Краевой угол для пленок БЦ полученных на глюкозе составил  $37,8^{\circ}\text{C}$ , для пленок БЦ, полученных на глицерине  $39,5^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Физико-механические характеристики пленок БЦ

Исследованы физико-механические характеристики пленок БЦ. Результаты измерения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Физико-механические характеристики пленок БЦ

Образец	Модуль Юнга, МПа	Предел прочности, МПа	Удлинение при разрыве, МПа
Сырые пленки БЦ (на глюкозе)	$7,59 \pm 0,6$	$0,65 \pm 0,3$	$4,62 \pm 0,6$
Сырые пленки БЦ (на глицерине)	$7,87 \pm 2,2$	$0,65 \pm 0,23$	$5,26 \pm 1,3$
Сухие пленки БЦ (на глюкозе)	$74,27 \pm 9,1$	$1,72 \pm 3,16$	$2,54 \pm 0,6$
Сухие пленки БЦ (на глицерине)	$84,61 \pm 6,1$	$1,78 \pm 9,6$	$1,93 \pm 0,4$
Лиофильные пленки БЦ (на глюкозе)	$43,64 \pm 79,0$	$1,46 \pm 0,8$	$4,58 \pm 1,1$
Лиофильные пленки БЦ (на глицерине)	$41,79 \pm 35,6$	$2,61 \pm 4,7$	$5,22 \pm 0,4$

По результатам проведенных исследований установлено, что на физико-механические характеристики пленок влияет наличие влаги и способ



высушивания. Наличие влаги в сырых пленках приводит к падению Модуля Юнга, но способствует увеличению удлинения при разрыве в 2-2,5 раза по сравнению с сухими пленками. Способ высушивания с использованием лиофилизации приводит к снижению Модуля Юнга пленок до 43 - 41 МПа, что скорее всего связано с попаданием воздуха в полость пленки и образование внутри пространства. Значения модуля Юнга пленок, высушенных при комнатной температуре, превышали Модуль Юнга сырых пленок в 1,9 раз.

### 3.6. Адсорбционные и десорбционные свойства пленок БЦ.

Косметические маски с тканевой или гелиевой основой должны обладать определенными адсорбционными и десорбционными свойствами для контролируемой доставки питательных или активных веществ.

Результаты определения свойств адсорбции пленок БЦ, высушенных при комнатной температуре, исследованы на примере воды и масла чайного дерева (Рис.9).

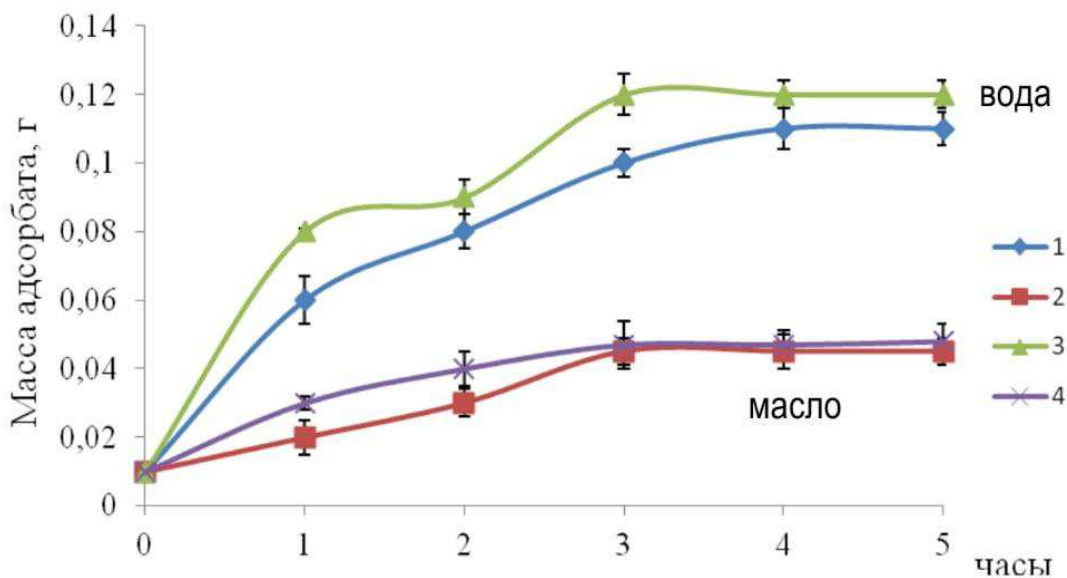


Рисунок 9 – Адсорбция воды и масла чайного дерева пленками БЦ: 1 – пленка БЦ на глюкозе (вода); 2 – пленка БЦ на глюкозе (масло); 3 – пленка БЦ на глицерине (вода); 4 – пленка на глицерине (масло)

Экспериментальные данные для обоих адсорбатов показали, что процесс влагонакопления пленками БЦ заканчивается в течение 3 часов и имеет характер полислойной адсорбции поверхностью бактериальной целлюлозы. При этом достоверной разницы в адсорбции масла среди пленок, полученных на разных субстратах нет. По отношению к воде пленки БЦ на глицерине обладают большей влагоемкостью. Эксперименты проведены с пленками, высушенными при комнатной температуре.

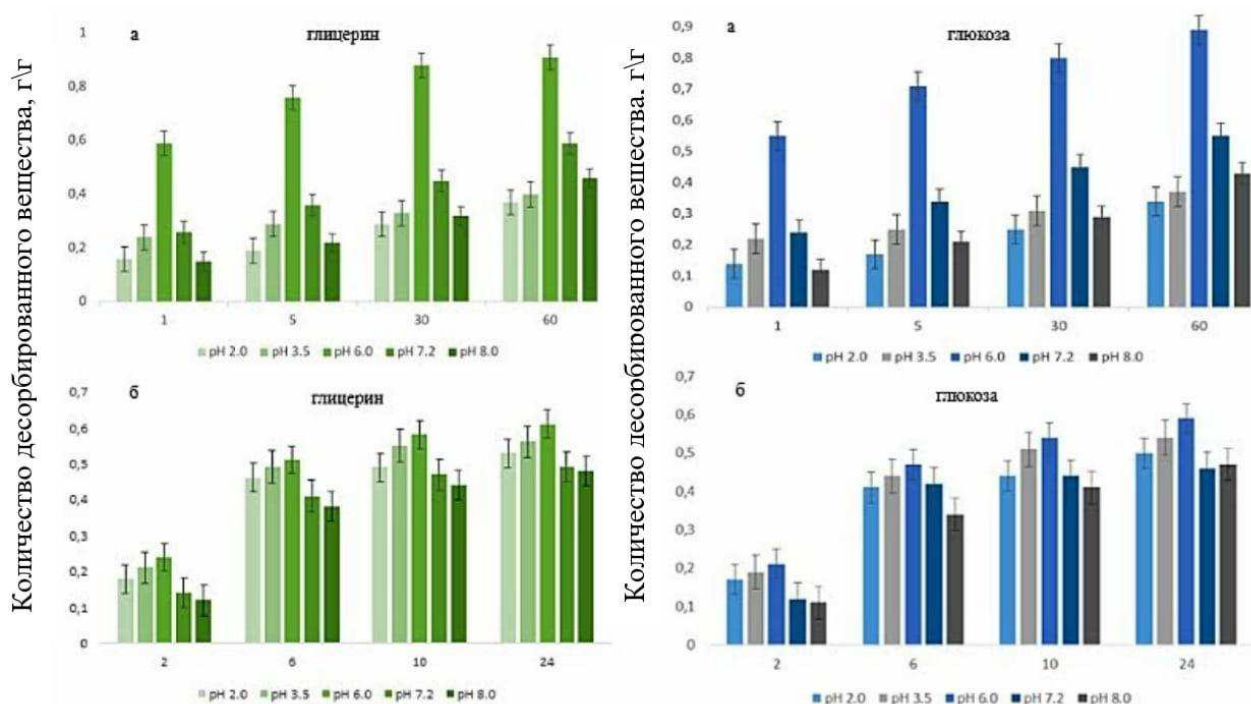


Рисунок 10 – Кинетика десорбции воды (а) и масла чайного дерева (б) из пленок БЦ

Результаты исследования десорбционных свойств пленок БЦ позволяют сделать вывод о том, что оба адсорбата быстрее десорбируются в раствор с pH 6.0 (Рис.10).

Процесс десорбции водой из пленки в раствор показал, что практически полностью завершается через 1 час. Процесс выделения масла чайного дерева из пленки в буферный раствор заканчивается через 24 часа, что указывает на

оптимальную скорость десорбции для аппликаций пролонгированного действия, а именно увлажняющего.

### **3.7. Исследование утилизации субстрата при выращивании БЦ**

По результатам продуктивности штамма на различных субстратах и физико-механическим характеристикам для изготовления косметической маски для лица в качестве основы были выбраны пленки с глицерином.

Использование более крупных ферментационных сосудов в виде лотков позволило масштабировать процесс и дать возможность получить пленки БЦ разных размеров (Рис.11).



Рисунок 11 – Результат масштабирования БЦ

Масса и толщина полученной пленки БЦ в исходном и высушенном состоянии, составила 85,08 г, 267,5 мкм и 1,97 г, 39,8 мкм, соответственно. Процессы масштабирования не изучали.

### **3.8. Исследование адгезионных свойств пленок БЦ в культуре клеток**

Способность пленок БЦ поддерживать рост и адгезию клеток была исследована в первичной культуре клеток фибробластов. Развитая структура поверхности способствовала прикреплению фибробластов и поддержанию их физиологических параметров. Клетки имели распластанную структуру с выраженными филоподиями (Рис.12).

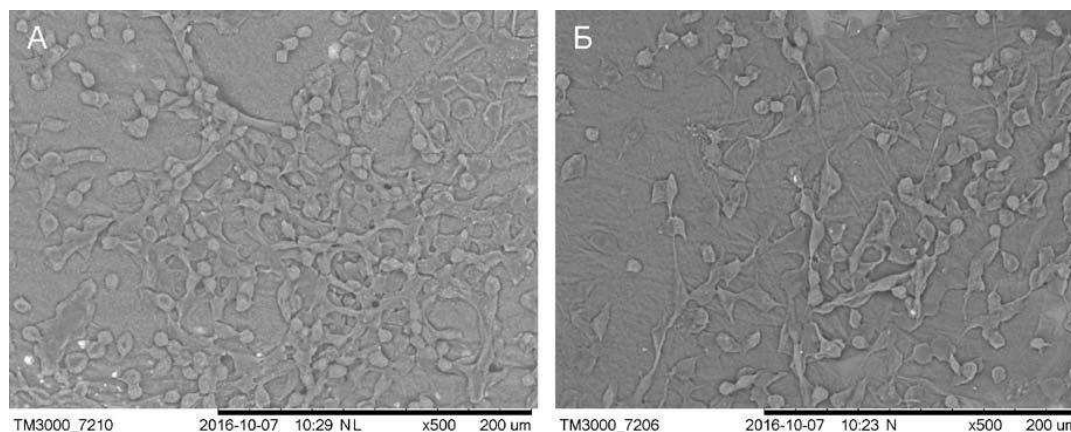


Рисунок 12 - СЭМ изображения мышинных фибробластов линии NIH 3T3 культивируемых на поверхности пленок БЦ, полученных на глицерине

По данным МТТ-теста количество жизнеспособных клеток на протяжении всего периода культивирования (3 суток) на пленках БЦ, полученных на глицерине было выше, чем в контроле и в конце эксперимента составило  $7,5 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup> (Рис.13).

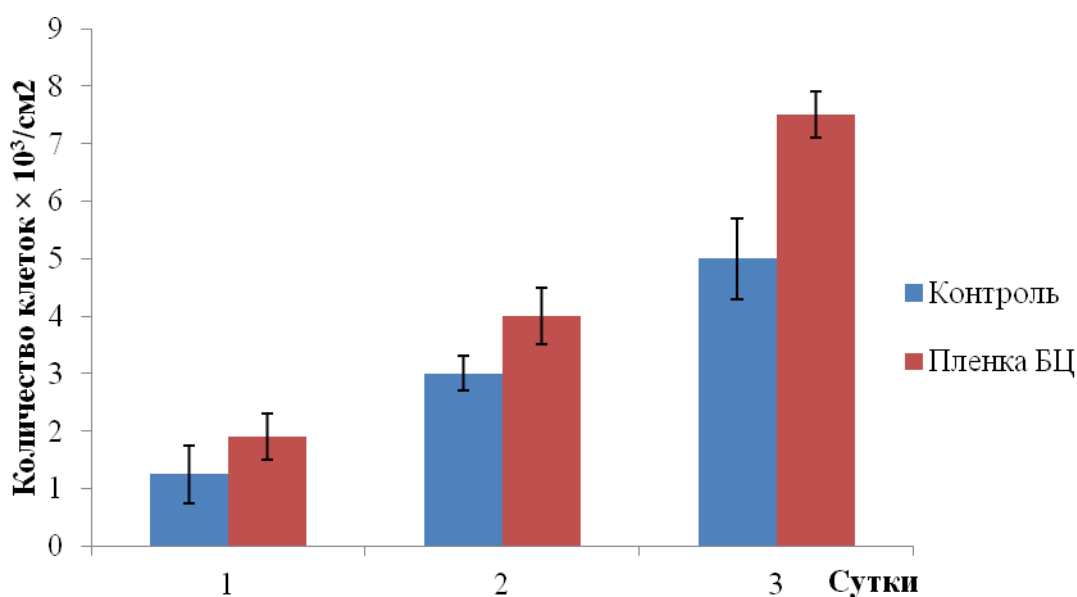


Рисунок 13 - МТТ-тест, оценка жизнеспособных клеток фибробластов линии NIH 3T3 культивируемых на поверхности пленок БЦ и контроле (полистирол)

Данные МТТ-теста были подтверждены окрашиванием флуоресцентным красителем DAPI, который окрашивает ядра живых клеток в голубой цвет(Рис.14).

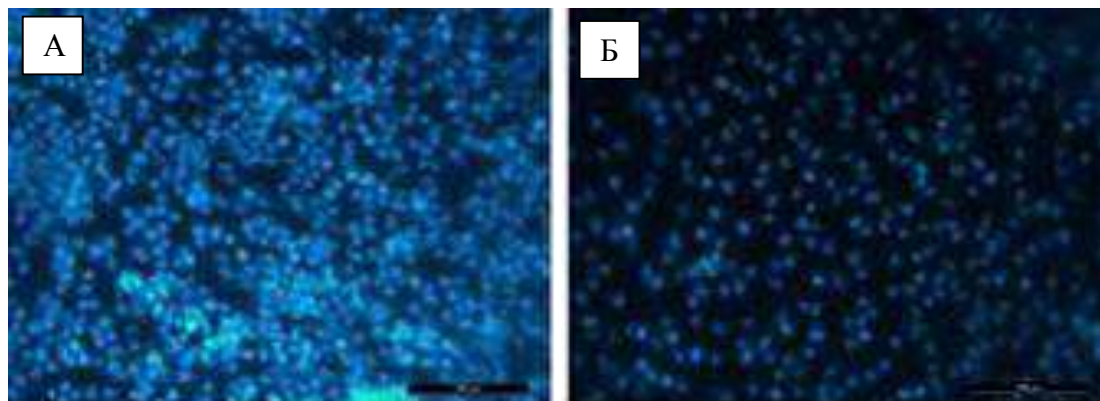


Рисунок 14 – Фибробласты мыши линии NIH 3T3 окрашены флуоресцентными красителями DAPI: А-пленка БЦ, Б-контроль

Таким образом, полученные пленки БЦ способны поддерживать рост и адгезию фибробластов мыши линии NIH 3T3 и могут быть использованы в качестве основы для косметических масок.

## **Выводы**

1. Поверхностным способом на различных субстратах получена и исследована бактериальная целлюлоза в культуре штамма *Komagataeibacter xulinus*. Установлено, что продуктивность выращивания пленок БЦ по сырой и сухой массе на глицерине выше (на 29,3 %), по сравнению с пленками БЦ на глюкозе.

2. Доказано, что на диаметр волокон пленок БЦ влияет в большей степени субстрат в отличие от способа высушивания. Пленки БЦ, синтезированные на глицерине имеют волокна диаметром преимущественно 142 мкм, в отличие от волокон пленки синтезированной на глюкозе (230 мкм).

3. Установлено, что на физико-механические свойства пленок БЦ влияют наличие влаги и способ высушивания. Значения модуля Юнга пленок БЦ ( $84,61 \pm 6,1$  Мпа), высушенных при комнатной температуре, превышали Модуль Юнга сырых и лиофилизированных пленок в 10 и 1,9 раз, соответственно.

4. Доказано, что адсорбционные и десорбционные свойства пленок БЦ зависят от субстрата и используемого раствора, pH и времени экспозиции. Влагоемкость пленок БЦ синтезированных на глицерине в воде в 1,2 раза выше пленок, полученных на глюкозе, при этом десорбция масла и воды из пленок БЦ выше при pH раствора равного 6.

5. Способность пленок БЦ, синтезированных на глицерине, поддерживать рост и адгезию клеток доказана в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3. Полученные пленки БЦ по всем характеристикам рекомендованы для использования и дальнейшего изучения в качестве основы косметических масок.

## Список использованных источников

1. Лияськина, Е. В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов / Е.В. Лияськина, В.В. Ревин, М.И. Назаркина, А.О. Богатырева, М.В. Щанкин // Актуальная биотехнология. 2015. № 3 (14). С.31-32.
2. Волова, Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета, 2014. – Т.7. №2. С. 103-133.
3. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский // Торсинг. – Харьков, 1997. – Т.1. –С. 344.
4. Иванова, Л. А. Коллаген в технологии лекарственных форм / Л.А. Иванова, И.А. Сычеников, Т.С. Кондратьева // Медицина, 1984. – 112 с.
5. Полонская М. В. Разработка состава и технологии лиофилизированных глазных препаратов на коллагене: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Курск, 2001. – 23 с.
6. Истранова, Е. В. Новая субстанция коллагена / Е.В. Истранова, Р.К. Абоянц, Л.П. Истранов, Е.Н. // Ихтиокол. Фармация. – 2004. – №5 – С. 34–36.
7. Балабаев, В. С. Хитин и хитозан / В.С. Балабаев, Л.В. Антипова // Материалы XXI века. Успехи современного естествознания. - 2012. № 6. С. 130.
8. Островский, Н. В. Оценка эффективности применения инновационных раневых биопокровов на основе хитозана при лечении ожоговых ран у крыс / Н.В. Островский // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Матер. Одиннадцатой Международ. конф. - Мурманск, 2012. С. 386-391.
9. Иванушко, Л. А. Антибактериальные и антитоксические свойства хитозана и его производных / Л.А. Иванушко // Тихоокеанский медицинский журнал. 2007. № 3. С. 82-85.
10. Ефременко, Е. Н. Бактериальная целлюлоза: биокаталитический синтез и применение/ Е. Н. Ефременко, Н. А. Степанов, Т. А. Махлис, С. Д.

Варфоломеев // Химия биомассы: биотоплива и биопластики: Научный мир / Московский гос. ун-т. им. М. В. Ломоносова– Москва, 2017. – С. 763.

11. Пиневиц, А. В. Чудо - пленки, или слово о бактериальной целлюлозе / А. В. Пиневиц // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2007. - № 3. – С. 33 12. Petersen, N. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives / Petersen N., Gatenholm P. // Applied Microbiology and Biotechnology. 2011. V. 91(5). P. 1277-1286.

12. Баснакьян, И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакьян // Журнал Медицина. – Москва, 2002– С. 192.

13. Barsha, J. Reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XLVI. Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinus* on fructose and glycerol / J. Barsha, H. Hibbert // Canadian Journal of Research. – 1994. № 10. P. 170-179.

14. Ефременко, Е.Н. Бактериальная целлюлоза, биокаталитический синтез и применение / Е.Н. Ефременко, Н.А. Степанов, Т.А. Махлис, С.Д. Варфоломеев. // Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН-М. – 2011– С. 763-789.

15. Ross, P. Cellulose biosynthesis and function in bacteria / P. Ross, R. Mayer, M. Benziman // Journal of Medical Microbiology. – 1991. – P. 55, 35–58.

16. Faezah, E. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application / E. Faezah, F. Rahman // Biochemical Journal. – 2014. – P.532

17. Лияськина, Е.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов / Е.В. Лияськина, В.В. Ревин, М.В. Грошев // Мордов. ун-т. – Саранск, 2010. – С.73.

18. Гладышева, Е.К. Современные наукоемкие технологии / Е.К. Гладышева // Вест. – 2016. – С. 8, 36.

19. Хрипунов, А.К. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinus* для получения бактериальной целлюлозы / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. –С.384.



20. Muthukumarasamy, R. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice / R. Muthukumarasamy // *Systematic and applied microbiology*. –2005. – T. 28. №. 3. – P. 277-286.
21. Kiziltas E.E. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars / E.E. Kiziltas, A. Kiziltas, D.J. Gardner // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – № 124. – P. 131–138.
23. Koon-Yang, L. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boisynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites / L. Koon-Yang, G. Buldum // *Macromolecular Bioscience*. – 2014. – № 6. – P. 10-32.
22. Shi, Z. Food Hydrocoll / Z. Shi, Y. Zhang, G. Phillips // *Applied food biotechnology* – 2014, T.35, P. 539-545.
23. Shah, N. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material / N. Shah, M. Ul-Islam, W. Khattak, J. Park // *Carbohydrate Polymers*. 2013. V. 98(2). P.1585-1598.
24. Gelin, K. Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy / K. Gelin [et al.] // *Polymer*. – 2007. – № 48. – P. 7623–7631.
25. Rajwade, J.M. *Appl. Microbial. Biotechnol* / J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, J.V. Kumbhar //– 2015, T.99, P.2491-2511.
26. Cirul, A. Bacterial Cellulose Film Coating as Drug Delivery System / A. Cirul, I. Mond, A.Mond, A. Jamin // *Physicochemical*. – 2012. – P.561–568.
27. Lee, C. K. Cosmetic bio-cellulose mask pack sheet and method for manufacturing same / C.K. Lee, K.C. Hsu, J.C. Cho, Y.J. Kim, S.H. Han // US patent, US 20130244977 A1.
28. Legendre, J. Y. Assembly comprising a substrate comprising biocellulose, and a powdered cosmetic composition to be brought into contact with the substrate / J.Y. Legendre // US patent, US20090041815 A1.

29. Lin, Y. C. Cosmetic composition containing fragments of bacterial cellulose film and method for manufacturing thereof / Y.C. Lin, Y.C. Wey, M.L. Lee, P.C. Lin // US patent, US20150216784 A1.
30. Levinson, D. J. Microbial cellulose contact lens / D. J. Levinson // US patents, US 7832857 B2.
31. Amnuakit, T. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction / T. Amnuakit, T. Chusuit, P. Raknam, P. Boonme // Med Devices – 2011. - № 4. P. 77–81.
32. Almeida, I. F. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study / I.F. Almeida, T. Pereira, N.H. Silva, F.P. Gomes, A.J. Silvestre, C.S. Freire, J.M. Sousa, P.C. Costa // Journal Pharm Biopharm. – 2014. - № 86. – P.332–336.
33. Kim, J. H. Enhancement of keratinocyte differentiation by rose absolute oil / J.H. Kim, D.K. Choi, S.S. Lee // Annals of Dermatology. – 2010. – № 3. – P. 255-261.
34. Бочек А. М. Перспективы использования полисахаридов разного происхождения и экологические проблемы, возникающие при их переработке / А.М. Бочек // Химические волокна. - 2008. - №3. - С.18-22.
35. Николаева, Н. В. Барышева Н.В. Использование полисахаридов и дисахаридов в косметологии / Н.В. Николаева, Н.В. Барышева // С. 75-76.
36. Prudnikova, S.V. The New Strain of Acetic Acid Bacteria Komagataeibacter xylinus B-12068 – Producer of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications / S. V. Prudnikova, I.P. Shidlovsky // Journal of Siberian Federal University. Biology, 2017. – Т.10. - №2. – P. 246-254
37. Аблаев, А. Р. Химия биомассы: биотоплива и биопластики / А.Р. Аблаев, В. И. Быков, С.Д. Варфломеев // Научный мир. Москва. - 2017. Г.8. – С.763-789.

38. Lee K.Y. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites / L.Y. Lee // *Macromolecular bioscience*. – 2014. – №14. – P. 10-32.

39. Tome, L. C Recent Advances in Bacterial Cellulose / L.C. Tome, L. Brandao, A. Mendes // *Cellulose* - 2010, 17, 1203-1211.

40. Steinbuchel, A. Biopolymers for medical and Pharmaceutical Applications / A. Steinbuchel, R.H. Marchessault // *Wiley-Blackwell*. - 2005, P. 1145.

41. Nimeskern, L. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement / Nimeskern L., Avila H.M., Sundberg J., Gatenholm P., Müller R., Stok K.S. // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. - 2013. V. 22. P. 12-21.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт  
Базовая кафедра биотехнологии  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Т. Г. Волова

подпись

«26» июня 2020г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

код и наименование специальности

Получение и исследование пленок бактериальной целлюлозы в качестве основы  
для косметических масок  
тема работы

Руководитель



подпись

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

А. А. Шумилова

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись

В. В. Бротт

инициалы, фамилия

Красноярск 2020