

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

Утверждаю  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**  
**Бактериальная целлюлоза как носитель лекарственных веществ:**  
**биосинтез, депонирование, характеристика**

06.04.01 – Биология  
06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	доцент, канд. техн. наук	Е.Г. Киселев
Выпускник	_____		М.П. Ортис
Рецензент	_____	доцент, канд. техн. наук	Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Бактериальная целлюлоза как носитель лекарственных веществ: биосинтез, депонирование, характеристика» содержит 50 страниц текстового документа, 17 иллюстраций, 3 таблицы, и 53 использованных источников.

Ключевые слова: *бактериальная целлюлоза; Komagataeibacter xylinus; очищенный и сырой глицерин; биосовместимость; высвобождение лекарственного средства; антимикробную активность.*

Разработка новых материалов с уникальными характеристиками для улучшения качества жизни, является, актуальной задачей. Бактериальная целлюлоза (БЦ) уникальный материал, синтезируемый некоторыми микроорганизмами. Однако, как и многие продукты биотехнологии, БЦ имеет высокую себестоимость. Одним из путей снижения себестоимости БЦ является использование дешевых источников углерода и углеродсодержащих отходов различных производств. Это и определило цель настоящей работы. Исследовать применение глицерина различной степени очистки в качестве углеродного субстрата для синтеза БЦ, оценить биосовместимость полученных целлюлозных мембран, а так же оценить возможность использования БЦ в качестве носителя лекарственных средств.

Был исследован процесс синтеза БЦ на глицерине разной степени очистки в качестве единственного источника углерода. Установлено, что степень очистки глицерина оказывает влияние на процесс биосинтеза БЦ. Оптимальная концентрация для очищенного глицерина, составила 30 г/л для сырого глицерина 10 г/л. Наибольший рост клеток и биосинтез БЦ наблюдался на очищенном глицерине, удельная скорость роста составила  $0.29 \text{ сутки}^{-1}$ , выход БЦ составил 0.53 г с одного грамма глицерина.

Тест на биосовместимость показал безопасность полученных мембран для клеток, что открывает возможность для использования БЦ в медицине. Получены композиции БЦ с мирамистином и хлогексидином, исследована кинетика оттока препаратов в модельные среды. Установлено, что БЦ может выступать в качестве носителя лекарственных препаратов. Полученные композитные материалы показали свою эффективность против бактерий *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E.coli*.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
Глава 1. Обзор литературы .....	8
1.1 Бактериальная целлюлоза.....	8
1.2 Продуценты бактериальной целлюлозы .....	9
1.3 Структура бактериальной целлюлозы.....	10
1.4 Особенности использования бактериальной целлюлозы .....	10
1.5 Глицерин в качестве субстрата .....	12
1.6. Механизмы высвобождения лекарств .....	13
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	15
2.1 Объекты исследования.....	15
2.2 Методы исследования .....	15
2.2.1 Подготовка среды.....	15
2.2.2 Исследование влияние концентрации субстрата на синтез БЦ.....	15
2.2.3 Очистка БЦ.....	16
2.2.4 Измерение концентрации глицерина и рН.....	16
2.2.5 Расчет экономического коэффициента.....	17
2.2.6 Определение сухого веса и производительности .....	18
2.2.7 Определение удельной скорости роста бактерий.....	18
2.2.8 Подготовка образцов целлюлозы.....	19
2.2.9 Тест на биосовместимость.....	19
2.2.10 МТТ тест.....	19
2.2.11 Тест на жизнеспособность клеток.....	20
2.2.12 Тест на антимикробную активность .....	20
2.2.13 Кинетика оттока мирамистина .....	22
2.2.13.2 Кинетика оттока хлоргексидина .....	24
2.2.14 Математическое моделирование профилей высвобождения лекарственных средств.....	25
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	26
3.1 Синтез БЦ на двух типах глицерина.....	26
3.2 Результаты в производство бактериальной целлюлозы с глицерином .....	27
3.3 Результаты электронной сканирующей микроскопии.....	30
3.4 Тест на биосовместимость.....	31
3.5 Кинетика выхода дезинфицирующих препаратов из целлюлозных пленок.....	33

3.6 Оценка антимикробной активности диско-диффузионным методом .....	39
Выводы .....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	45

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов с уникальными характеристиками для улучшения качества жизни является актуальной задачей. Наиболее емкой и нуждающейся в современных материалах отраслей является медицина. Одной из критических проблем медицины является повышения эффективности лечения кожных дефектов, включая ожоги и гнойные раны, связанные с различными заболеваниями. Ожоги представляют собой серьезную медицинскую проблему в мировом масштабе, и их частота неуклонно растет в течение последних трех десятилетий. В России ожоги занимают шестое место среди причин травм, с частотой 2,1 – 2,4 случая на 1000 взрослых в год. Ежегодно в России от ожогов страдают от 420 000 до 450 000 человек, которые обращаются за медицинской помощью [1].

Бактериальная целлюлоза, перспективный материал, синтезируемый некоторыми микроорганизмами. БЦ может находить применение в различных областях медицины, фармацевтики и биологии, таких как инженерия костной и кожной ткани, как тест система для проведения бактериальных анализов (максимальная устойчивость к грамположительным бактериям), как материал для создания кровеносных сосудов. БЦ обладает нейронной проводимостью, а так же может применяться для создания композиций для контролируемого высвобождения лекарственных средств [2].

Производство БЦ сопряжено с высокими затратами, и поэтому использование промышленных отходов и побочных продуктов в качестве средств ферментации может повысить конкурентоспособность производства [3].

Глицерин - простейший, широкодоступный и относительно дешевый полиол 3-С, образуется как побочный продукт производства биодизельного топлива. Глицерин давно известен как компонент некоторых микробиологических сред в

микробиологии, но его высокая цена и ограниченное производство сдерживало его применение как субстрата в биотехнологии. Однако ситуация изменилась с развитием технологий получения биотоплива. Его выход составляет около 10 % при производстве биодизельного топлива, где в качестве сырья используются растительное масло, животные жиры или отработанное растительное масло [4].

Цель работы – Исследовать процесс биосинтеза БЦ используя глицерин различной степени очистки в качестве единственного источника углерода. Оценить возможность использования полученной БЦ в качестве носителя лекарственных препаратов на примере мирамистина и хлоргексидина.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать процессы синтеза бактериальной целлюлозы с использованием в качестве субстрата глицерина различной степени очистки.
- 2) Оценить биосовместимость мембран на основе БЦ для их использования в медицинских целях.
- 3) Исследовать процесс высвобождения мирамистина и хлоргексидина из целлюлозных мембран. Оценить антимикробную активность полученных композиций.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ и лаборатории биотехнологии новых биоматериалов.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Бактериальная целлюлоза

Целлюлоза - это внеклеточный полисахарид, производимый высшими растениями, низшими фототрофами и микроорганизмами, принадлежащими к родам *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Komagataeibacter*, *Escherichia Coli*, и *Sarcina* [6,1]. Бактериальная целлюлоза ( $C_6H_{10}O_5$ ) по химическому строению идентична растительной целлюлозе, но ее физико-химические характеристики отличаются. Целлюлозные волокна, полученные из бактерий, примерно в 100 раз тоньше растительных, которые связаны межмолекулярными и внутримолекулярными водородными связями и имеют диаметр 20-100 нм, что обусловлено особенностями синтеза [7, 1]. Сравнение свойств БЦ и растительного аналога приведено в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение свойств бактериальной и растительной целлюлозы [8]

Свойства	БЦ	Растительная целлюлоза
Прочность на разрыв (МПа)	20-300	25-200
Модуль Юнга (Мпа)	20000	2.5
Влагосвязывающая способность (%)	>95	25-35
Ширина волокон (нм)	20-100	Неск. мкм
Кристалличность (%)	74-96	40-85
Относительная гидрофильность (%)	40-50	20-30
Чистота (%)	>99	< 80
Степень полимеризации	14000-16000	300-10000
Пористость (%)	>85	< 75



Общая поверхности (м2 / г)	площадь	>150	< 10
-------------------------------	---------	------	------

## 1.2 Продуценты бактериальной целлюлозы

Штамм бактерий с самым высоким уровнем биосинтеза целлюлозы - *Komagateibacter xylinus*, также известный как *Gluconacetobacter xylinum* [9]. *K. xylinus* - ацидофильная, аэробная палочковидная, грамотрейная, каталазоположительная и оксидазотрицательная бактерия, чувствительная к концентрации NaCl выше 0,5% [5]. Эта бактерия способна превращать глюкозу и другие органические субстраты в целлюлозу. *K. xylinus* окисляет этиловый спирт до уксусной кислоты и преобразует глюкозу в глюконовую кислоту в своем обычном жизненном процессе [8].

Бактерии *K. xylinus* можно получить из цитрусового сока, китайского уксуса, яблочного уксуса и фруктов, таких как сливы, яблоки и виноград [8].

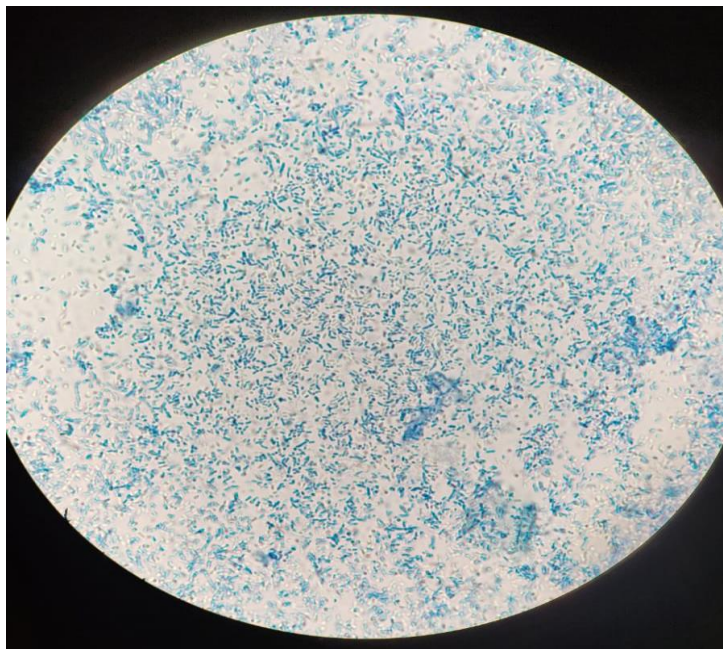


Рисунок 1. Изображение бактерий *K. xylinus* при окрашивании метиленовым синим

### 1.3 Структура бактериальной целлюлозы

Микробные клетки в процессе производства БЦ полимеризуют различные источники углерода в  $\beta$ -1,4-глюкановые цепи, которые последовательно синтезируются, собираются в культуральной среде и производят микрофибриллы и макрофибриллы, чтобы в итоге получить ленты [6].

Виды *Komagateibacter* производят две формы целлюлозы: целлюлозу I и целлюлозу II. Распределение  $\beta$ -1,4-глюкановых цепей отличается в целлюлозе I и целлюлозе II, поскольку  $\beta$ -1,4-глюкановые цепи в целлюлозе I расположены одноосно, образуя ленту, состоящую из микрофибрилл, в то время как в целлюлозе II  $\beta$ -1,4-глюкановые цепи расположены беспорядочно, образуя аморфный полимер, в котором присутствует большее количество водородных связей, повышающих термодинамическую стабильность целлюлозы [10,11]. Строение БЦ представлено на рисунке 2.

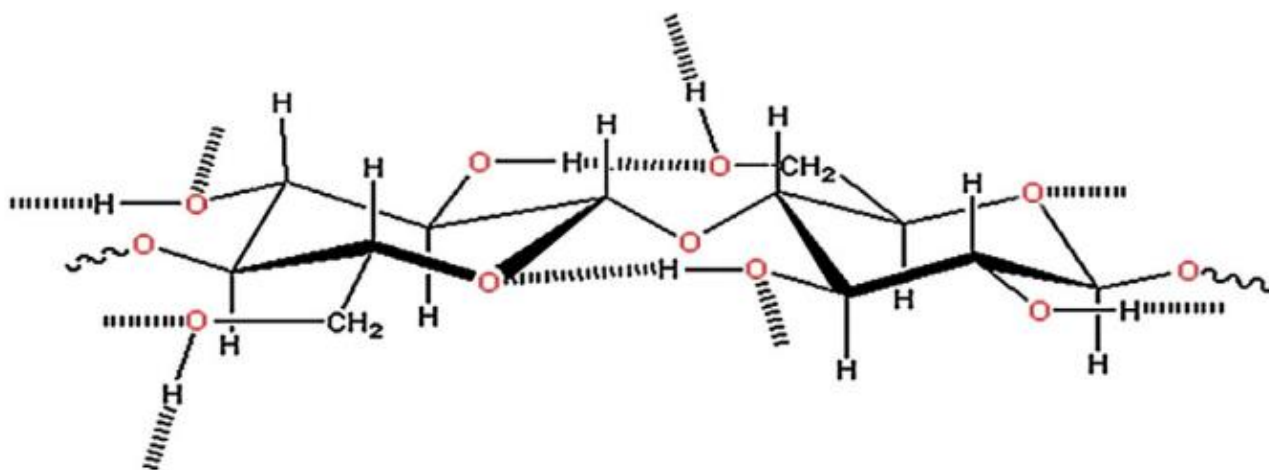


Рисунок 2. Химическое строение целлюлозы [12]

### 1.4 Особенности использования бактериальной целлюлозы

Есть большое количество работ, в которых БЦ используется в композиции с углеродными наполнителями (углеродные и графеновые нанотрубки), наночастицами металлов (серебро, золото, медь) для получения новых материалов

с улучшенными функциональными возможностями для различных биомедицинских применений (искусственные кровеносные сосуды, антибактериальные препараты, костные имплантаты, повязки для заживление ран, носители для доставки лекарств, офтальмологические и биосенсорные материалы) [13].

Было показано, что бактериальная целлюлоза демонстрирует высокий уровень биосовместимости с различными типами клеток и тканей млекопитающих. Биосовместимость обусловлена её превосходной способностью поглощать воду [6]. Бактериальная целлюлоза оказалась биоматериалом, способным генерировать приемлемый биологический ответ, жизнеспособность клеток была зарегистрирована в фибробластах мышцы NIH 3T3 [5] и клеток Нер-2 [14].

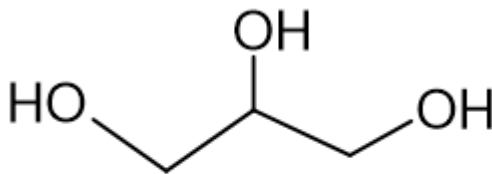
Бактериальная целлюлоза с добавлением антисептиков обладает хорошими антимикробными свойствами. Имеются сведения, когда композиции БЦ с хемосорбированными антисептиками (хлоргексидин, циклодекстрин, октенидин гидрохлорид, повидон-йод, лактат этакридина, растворы супероксидированного гипохлорита, куркумин, этанольные растительные экстракты), применялись против биопленок, образованных патогенами. такими как грамположительные бактерии (*S. aureus*), грамотрицательные (*E.coli*) и грибки (*C. albicans*). Все эти исследования подтверждают, что БЦ - это идеальный материал для биомедицинских применений [12, 13, 14, 15].

Одним из требований применяемым к некоторым медицинским материалам является биодegradация [6]. Для БЦ сложность деградации объясняется высокой степенью кристалличности и компактной структурой. Биодegradация бактериальных целлюлозных имплантатов осложняется отсутствием ферментов, которые разрушают целлюлозу в клетках или тканях млекопитающих, однако имеются сообщения об опосредованной деградации БЦ в воде, фосфатно-

буферном солевом растворе (PBS) и симулированной жидкости организма без изменения первоначальной волокнистой сети [6].

### 1.5 Глицерин в качестве субстрата

Глицерин, в качестве сырья, находит применение для производства широкого спектра продуктов, таких как: косметика, продукты питания, краски, кожа, фармацевтические препараты, бумага, текстиль, химикаты и табак [19]. Его выход составляет около 10% в качестве побочного продукта производства биодизельного топлива и других продуктов, таких как мыло, жирные кислоты, производство сложных эфиров жиров, технологии производства которых включают реакцию переэтерификации триглицеридов. Химическая формула глицерина представлена на рисунке 3.



Глицерин

Рисунок 3. Химическое строение глицерина

Три группы COOH на единицу глюкозы в целлюлозных волокнах полярны, что приводит к образованию ими водородных связей друг с другом и удержанию воды в гидрогеле. Когда БЦ полностью гидратирован, эти силы позволяют воде составлять более 99% его веса; тем не менее, их недостаточно, чтобы предотвратить испарение молекул воды с поверхности БЦ при контакте с воздухом. Глицерин - еще одна полярная молекула с тремя OH-фрагментами, которые позволяют ему образовывать три водородные связи на молекулу. В отличие от трех молекул воды, три полярные группы глицерина соединены 3-С-цепью, что придает ему стабильность и предохраняет от испарения при нормальной температуре [20].

Глицерин, известный как простейший, широко доступный и относительно дешевый полиол 3-С, считается перспективным побочным продуктом для производства БЦ [5,12].

Было исследовано влияние глицерина на образование БЦ. Например, использование среды с 3% глицерином в качестве источника углерода дает в 3,8 раза больше целлюлозы по сравнению со средой содержащей глюкозу [8].

Концентрация глицерина играет важную роль в производстве бактериальной целлюлозы, именно по этой причине проводятся различные исследования, в ходе которых можно подтвердить более высокое производство БЦ. Исследование, проведенное Dirshit и соавт. (2020), предполагает, что использование чистого глицерина является лучшим субстратом для производства ВС по сравнению с сырым глицерином [22]. Было зарегистрировано другое исследование, в котором добавление глицерина к среде HS-MgSO<sub>4</sub> может быть использовано в качестве субстрата для получения БЦ, полученная БЦ обладает лучшими механическими свойствами по сравнению с целлюлозой синтезированной на сахаросодержащих субстратах [23].

Использование глицерина оказывается привлекательным с экономической точки зрения. Стоимость очищенного глицерина (99%) составляет 59,15 руб./кг, а стоимость глицерина не очищенного (82%) составляет 44 руб./кг [24].

#### 1.6. Механизмы высвобождения лекарств

Изучение и математическое моделирование оттока лекарственных средств из полимерной матрицы имеет значение для оптимизации конструкции носителя, сокращения затрат и времени разработки и понимания поведения системы выпуска. Модели Higuchi и Korsmeyer-Peppas часто применяются для анализа оттока лекарств из-за их способности описывать, прогнозировать и настраивать профили высвобождения полимерных систем доставки лекарств.

Модель Хигучи основана на следующих гипотезах:

1. Начальная концентрация лекарственного средства в матрице намного превышает растворимость лекарственного средства;
2. Диффузия лекарственного средства происходит только в одном направлении;
3. Частицы лекарственного средства намного меньше толщины системы;
4. Разбухание и растворение матрицы незначительны;
5. Диффузионная способность лекарственного средства постоянна;
6. В условиях выпуска всегда достигаются идеальные условия оттока [25].

Модель Корсмейера и др. описывает диффузию растворенного вещества в гидрофильном полимере, в котором вода имеет подвижность, и лекарственное средство может свободно диффундировать [26].

## Глава 2. Объекты и методы исследования

### 2.1 Объекты исследования

Объектом исследования в настоящей работе были уксуснокислые бактерии, *Komagataeibacter xylinus* В-12068, и глицерин различной степени очистки (99,5% и 82,07%) в качестве субстрата для производства целлюлозы.

Глицерин чистоты 99,5% обладает следующими характеристиками: прозрачная, почти бесцветная, гигроскопичная, сиропобразная жидкость с мягким типичным запахом, удельная вязкость  $1.249 \text{ мин}^{-1}$ , содержание хлоридов  $<0,001$ , общее количество органических примесей  $0,10 \text{ max}$ , тяжелые металлы  $<5 \text{ ug/g}$ , влагоемкость  $0,3 \text{ max}$  [27]. Неочищенный глицерин чистотой 82,07% обладает следующими характеристиками: вязкий, запах характерный глицерину, желтоватых оттенков, содержание хлоридов 4,35%, органические примеси 1,38%, влагоемкость 9,88%, зольность 6,59% [28].

### 2.2 Методы исследования

#### 2.2.1 Подготовка среды

В 1 л дистиллированной воды добавляли 5 г дрожжевого экстракта и доводили до кипения, затем добавляли 5 г пептона. Далее в колбу добавили 2,7 г  $\text{NaHPO}_4$  и 1,15 г лимонной кислоты. Готовую культуральную среду стерилизовали в автоклаве при температуре  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 часа.

#### 2.2.2 Исследование влияние концентрации субстрата на синтез БЦ

Для определения наиболее подходящих условий для производства бактериальной целлюлозы из *Komagataeibacter xylinus* В-12068, были проведены три различных анализа. Все испытания проводились в трех повторности с различными концентрациями чистого и неочищенного глицерина при плотности  $1,26 \text{ г/см}^3$ . Концентрации глицерина, в эксперименте, составляли 5, 10, 20, 30, 40 и 50 г/л.

Все работы проводились в асептических условиях с использованием шкафа ламинара. Питательную среду добавляли в колбы Эрленмейера (100 мл). Затем добавляли 25 мл инокулята *K. xylinus* и расчетное количество глицерина. Далее колбы помещали в термостат на 5 суток.

### 2.2.3 Очистка БЦ

Полученные пленки БЦ отделяли фильтрацией от культуральной среды и заливали 0,1 Н раствором Na(OH), и ставили на горячую плиту и шейкер на сутки. Затем мембраны извлекали из раствора и промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной воды. Целлюлозные мембраны смачивали этиловым спиртом и хранили в холодильнике при +5 °С. БЦ производство был рассчитан по следующей формуле:

$$\text{БЦ производство } \left(\frac{\text{г}}{\text{л}}\right) = \frac{\text{масса БЦ (г)}}{\text{объем среды для брожения (л)}} \cdot (1)$$

### 2.2.4 Измерение концентрации глицерина и рН

Концентрацию глицерина в процессе синтеза БЦ определяли по реакции с хромотроповой кислотой:

- 1) 20 мл из жидкой среды и 10 мл H<sub>2</sub>O
- 2) Перелейте 2 мл подготовленного образца (жидкая среда и вода) в пробирку.
- 3) В контрольную пробирку добавить 2 мл дист. H<sub>2</sub>O
- 4) В обе пробирки добавить 0.1 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10н добавить 0.5 мл NaIO<sub>4</sub> 0.1M
- 5) Ждать 5 минут
- 6) Добавить 0.5 мл NaHSO<sub>3</sub>
- 7) 1 мл разведений перенести в пробирку с притертым краем и добавить 5 мл хромотроповой кислоты, закрыть стеклянными крышками.
- 8) Поставить на кипящую водяную баню на 30 мин
- 9) После охлаждения до комнатной температуры измерить растворы на ФЭКе при длине волны 570 нм



На основе полученных значений концентрации глицерина был получен калибровочный график, рисунок 4.

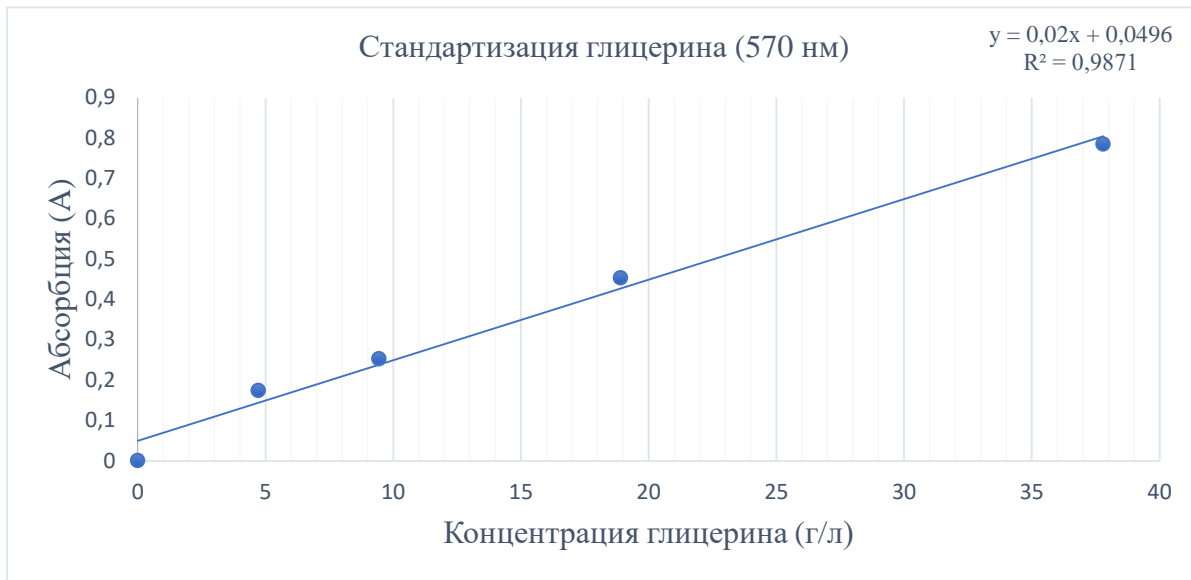


Рисунок 4. График стандартной калибровки глицерина

Уравнение, полученное для расчета концентрации глицерина, имело вид  $y=0,022x$  и  $R^2 =0.9637$ . Концентрация глицерина рассчитывалась по следующей формуле:

$$S(\text{glic}) = \frac{DO}{0,22}, (2)$$

Где DO - оптическая плотность, а "0,22" – угловой коэффициент.

pH жидкой среды измеряли с использованием pH / Ion Seven Compact 220.

#### 2.2.5 Расчет экономического коэффициента

Коэффициент экономии дает ценную информацию об эффективности процесса производства целлюлозы. Его можно рассчитать по следующей формуле:

$$y = \frac{x}{s}, (3)$$

Где, “x” показывает концентрацию бактериальной целлюлозы, а “s” показывает расход глицерина на синтез БЦ.

### 2.2.6 Определение сухого веса и производительности

Абсолютное содержание сухого вещества (a.d.m) получается при удалении влаги из сырой целлюлозы, в результате чего получается сухой вес БЦ. Влажность целлюлозы измерялась с помощью влагомера Меттлер Толодо HE53.

Продуктивность (P) БЦ рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$P = \frac{A.d.m}{v \times t}, (4)$$

Где a.d.m-абсолютно сухое вещество, v - объем, а t - время

### 2.2.7 Определение удельной скорости роста бактерий

Метод оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии проводится в камере Горяева. Концентрация бактерий рассчитывали по следующей формуле, x - число клеток в 1 мл исследуемой взвеси; а - число клеток в 20 квадратах; b - разведение исходной взвеси микроорганизма [29] .

$$x = \frac{a * 225 * 1100}{20} \cdot (b) = a * 12375 * b, (5)$$

После получения количества клеток в 1 мл бактериального раствора с 9 мл дистиллированной воды рассчитывается удельная скорость роста бактерий по следующей формуле:

$$\mu_b = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1), (6)$$

Где,  $\mu_b$  - удельная скорость роста ( $ч^{-1}$ ),  $X_2$  - концентрация бактерий в конце периода времени (клет/мл),  $X_1$  - концентрация бактерий в начале периода времени (клет/мл),  $t_2$  - конечное время (сутки) и  $t_1$  – начальное время (сутки) [30].

### 2.2.8 Подготовка образцов целлюлозы

Из БЦ изготавливали диски диаметром 4 мм. Полученные образцы разделили на две группы: первые высушивали в сушильном шкафу при 100°C, вторые высушивали лиофильно при – 30 °С. Образцы целлюлозы помещали в планшет 96 лунок.

### 2.2.9 Тест на биосовместимость

Для стерилизации образцы целлюлозы промывали 200 мкл этанола в течение 5 минут. Затем проводится промывка (3 раза по 3 мин) с использованием 200 мкл дистиллированной воды на каждую лунку. Затем образцы целлюлозы были перенесены в планшет. В каждую лунку добавляли по 1 мл DMEM-среды как базальная среда для стимулирования роста клеток млекопитающих.

Биосовместимость образцов была протестирована на клетках C2C12, клеточной линии миобластов мыши. C2C12 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 1% антибиотика/противогрибкового средства и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Планшеты выдерживали CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли для обычных пассажей с использованием трипсина путем инкубации в течение 3 минут.

### 2.2.10 МТТ тест

Жизнеспособность клеток на субстратах определяли колориметрически с использованием метаболического красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ). Клетки культивировали в 96-луночном планшете с плотностью посева  $40 \times 10^3$  клеток/лунку. Через 72 ч в каждую лунку добавляли раствор МТТ (0,25 мг/мл в DMEM) и инкубировали клетки в течение 4 ч при 37°C. Во время инкубации краситель восстанавливается до темно-синих кристаллов формазана. Среду удаляли и кристаллы формазана растворяли в 150 мкл ДМСО в течение 15 минут, оптическую плотность определяли с помощью считывателя микропланшетов iMark, Bio-Rad при  $\lambda = 550$  нм.

Жизнеспособность клеток ( %) определяли по следующему уравнению:

$$\text{Осуществимость ( \% )} = ([A1]\text{образец}/[A2]\text{контроль})100, (7)$$

где [A1] -оптическая плотность образца, [A2] - оптическая плотность контрольного образца.

#### 2.2.11 Тест на жизнеспособность клеток

Клетки, выращенные в исследуемых образцах, фиксировали в 4% растворе формальдегида в ФБС, трижды промывали ФБС, чтобы удалить остатки фиксатора. Клетки были пермеабелизированы путем инкубации образцов с 1% раствором Triton x-100 в течение 15 минут для изменения проницаемости клеточной мембраны, промывали ФБС трижды. Для окрашивания клеточной цитоплазмы образцы инкубировали с красителем 5/6- fluorescein isothiocyanate (FITC) (25 мкг/мл) в течение 1 часа в темноте и промывали ФБС. Ядра окрашивали 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (5 мкг/мл) в течение 10 мин в темноте, а затем проводили две промывки ФБС. Изображения были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 200.

#### 2.2.12 Тест на антимикробную активность

Антисептиками, использованными в антимикробном тесте, были мирамистин и хлоргексидин.

Мирамистин ( $C_{26}H_{47}ClN_2O$ ) - местный антисептик с широкой противовирусной, антимикробной активностью в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E.coli*. применяется для перевязки ран [31]; противогрибковая активность проявляется против *Candida* и *Aspergillus*, включая активность против биопленок [15,16] . Взаимодействие МИР с клеточной мембраной приводит к маскировке клеточных рецепторов, разрушению мембраны и утечке клеточного содержимого[31].

Хлоргексидин (ХЛО) ( $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$ ) представляет собой антисептик, который ингибирует ферменты и свертывает белки и компоненты цитоплазмы.

ХЛО связывается с цитоплазматической мембраной и вызывает ее разрушение, низкая концентрация может быть бактериостатической, в то время как высокая концентрация может оказывать бактерицидное действие [15]. ХЛО проявляет широкий спектр действия в отношении грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерий, грибов, вирусов, простейших, а также оказывает антибактериальное действие на биопленки [18,19, 17].

Для антимикробного теста использовали грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные (*P. aeruginosa* *E. coli*). Тест проводился по диско-диффузионному методу Кирби-Бауэра. Стерильную среду Мюллера-Хинтона разливали в чашки Петри. Микробную суспензию инокулировали на поверхность агара и оставляли при комнатной температуре. Диски из бактериальной целлюлозы диаметром 6 мм, пропитывали коммерческими растворами мирамистина (0,58 мг/мл) и хлоргексидина биглюконата (0,05%) в течение 24 часов (рис. 5), затем помещали на поверхность агара с помощью пинцета. Чашки Петри инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, а диаметры зона подавления роста (мм) измеряли через центр диска в трех направлениях, рисунок 5. Каждый образец целлюлозы был протестирован 2 раза для статистического анализа.

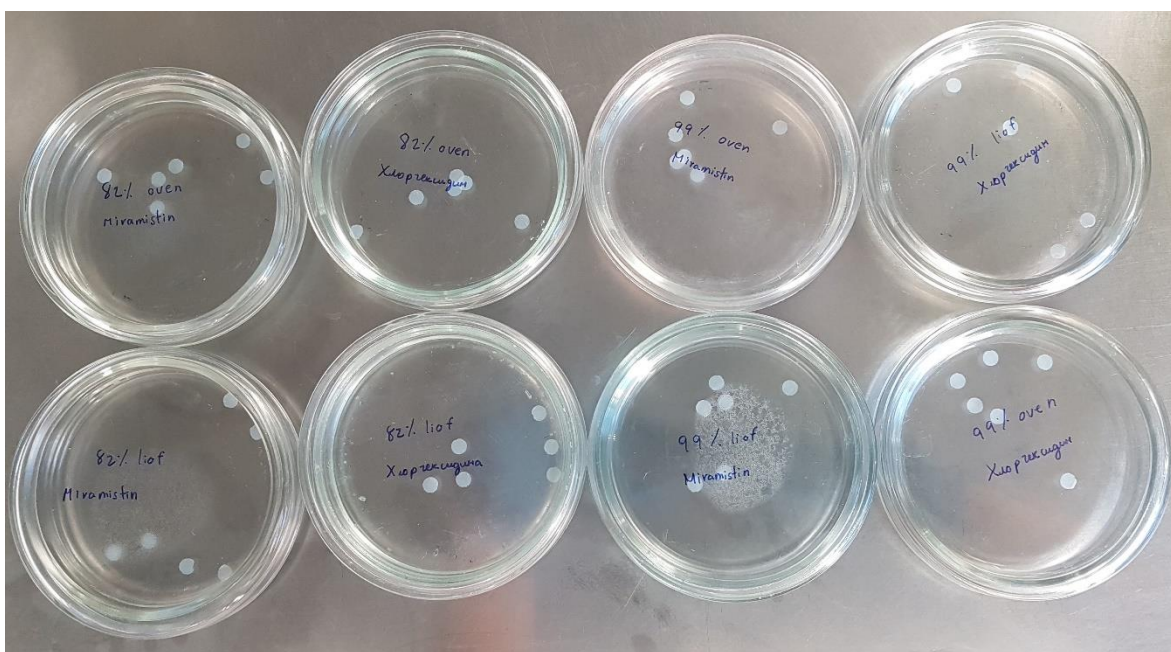


Рисунок 5. Диски из целлюлозы, полученной на среде с глицерином 82 и 99% концентрации, высушенные в сухожаровом шкафу и лиофилизированные, нагруженные с мирамистином и хлоргексидином

### 2.2.13 Кинетика оттока мирамистина

Пленки БЦ (6 см x 6 см x 1 см) высушивали при температуре 105 °С и лиофильно. Образцы БЦ пропитывали препаратом мирамистина или хлоргексидина методом погружения и выпаривания. Эксперимент проводился в трех повторностях для каждого типа мембран.

Раствор мирамистина в концентрациях 0,58, 0,28, 0,14, 0,07, 0,04 мг /мл готовили с использованием следующей процедуры: исходный раствор (0,58 мг/мл) препарата разбавляли PBS для получения желаемых концентраций. Показания были получены при 263 нм на спектрофотометре GENESYS Tm 10. На рисунке 6 представлена калибровочная кривая.

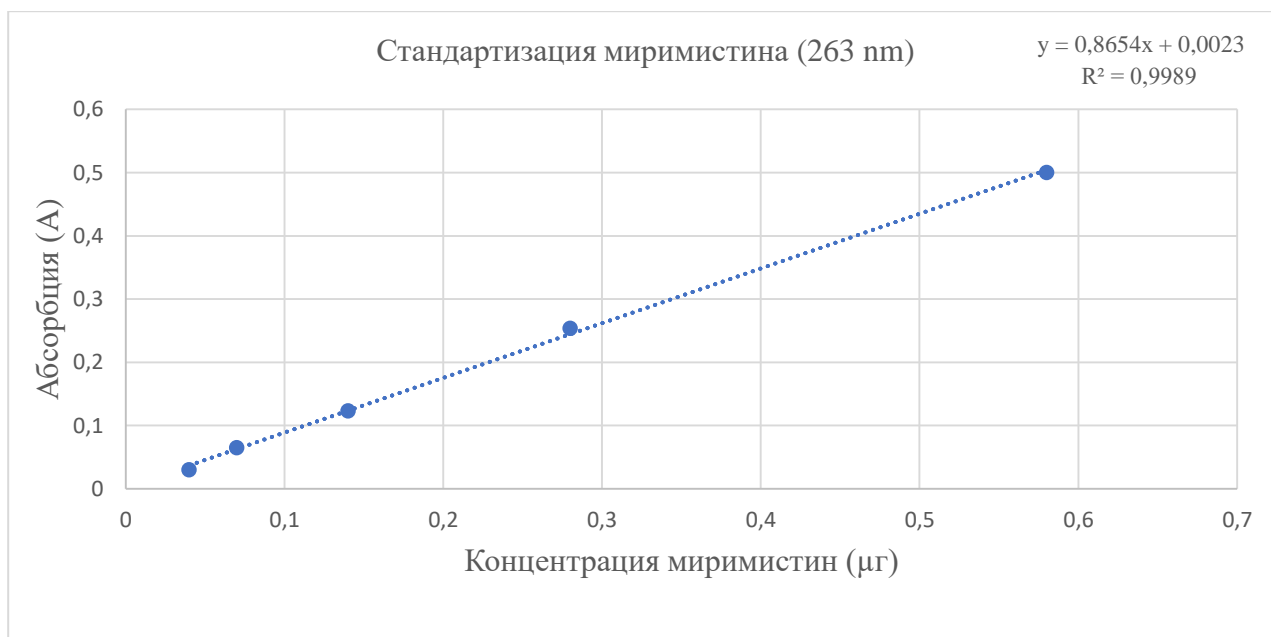


Рисунок 6. Стандартный калибровочный график мирамистина

Уравнение, полученное для концентрации мирамистина, имело вид

$$y = 0.8654x + 0.0023 \quad (R^2 = 0.9989).$$

Каждый пленки БЦ погружали в 10 мл мирамистина для загрузки лекарственного средства в БЦ. Раствор лекарственного средства перемешивают со скоростью 50 об/мин при комнатной температуре в течение 24 часов, чтобы обеспечить достижение равновесия. Мембраны взвешивали до и после нагружения образцов препаратом.

Для сушки пленки БЦ, заполненного лекарственным средством, использовались два различных метода: сушильный шкаф и лиофильную сушку. Затем мембраны, нагруженные лекарственным средством, погружали в 10 мл фосфатного буфера. Далее отбирали 1 мл буфера и анализировали на спектрофотометре при 263 нм на мирамистин. Пробы отбирали через 30 минут, 1,2,3 и 4 часов.

Нагрузку лекарственного средства рассчитывали как процент эффективности улавливания (ЭУ), используя следующее уравнение:

$$\text{ЭУ (\%)} = \frac{K_p \cdot 100\%}{K_m}, (8)$$

где  $K_m$  - концентрация мирамистина в мембранах БЦ, а  $K_p$  - концентрация лекарственного средства в растворе для погружения с PBS (мг).

### 2.2.13.2 Кинетика оттока хлоргексидина

Раствор хлоргексидина в концентрациях 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 мг /мл готовили с использованием следующей процедуры: исходный раствор (50 мг/мл) препарата разбавляли фосфатного буфера для получения желаемых концентраций. Показания были равны 230 нм. На рисунке 7 представлена калибровочная кривая.

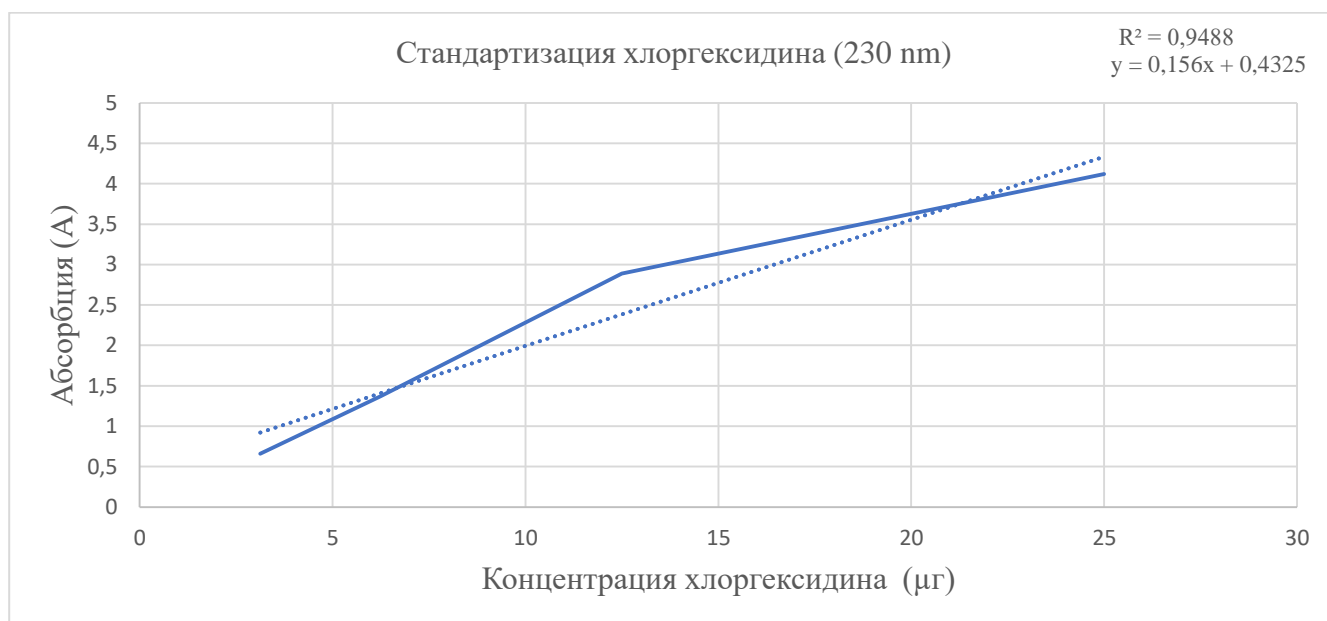


Рисунок 7. Стандартный калибровочный график хлоргексидина

Уравнение, полученное для концентрации хлоргексидина, имело вид

$$y = 0.156x + 0.4325 \quad (R^2 = 0.9488).$$

Методика оценки кинетики оттока аналогично как в п.п.2.2.13.1.



## 2.2.14 Математическое моделирование профилей высвобождения

лекарственных средств

Для дальнейшего изучения механизма высвобождения лекарственных средств из бактериальной целлюлозы использовали две фармакокинетические модели (Хигучи и Корсмейера–Пеппа), уравнения для которых приведены ниже.

$$\text{Модель Хигучи: } Q = kt^{\frac{1}{2}}, (9)$$

$$\text{Модель Корсмейера–Пеппа: } Q = kt^n, (10)$$

Где  $k$ ,  $Q$ ,  $n$  и  $t$  - кинетическая константа, кумулятивное высвобождение лекарственного средства, экспоненциальный коэффициент и время высвобождения соответственно [34].

В модели Корсмейера–Пеппа значение  $n$  характеризует механизм высвобождения лекарственного средства, как описано в таблице 2

Таблица 2 – Типы механизмов диффузионного высвобождения из полимерных пленок [34].

Экспоненциальный коэффициент ( $n$ )	Механизм транспортировки лекарственных средств
$n < 0.45$	Фиковская диффузия
$0.45 < n = 0.89$	Нефиксированный транспорт
$0.89$	Типа II транспортировка
$n > 0.89$	Супер типа II транспортировка

### **Глава 3. Результаты и обсуждение**

Страницы 26-43 изъяты в связи с авторским правом.

## Выводы

В ходе проведенных экспериментов были получены следующие выводы:

1) Был исследован процесс синтеза БЦ на глицерине разной степени очистки в качестве единственного источника углерода. Установлено, что степень очистки глицерина оказывает влияние на процесс биосинтеза БЦ. Оптимальная концентрация для очищенного глицерина, составила 30 г/л для сырого глицерина 10 г/л. Удельная скорость роста бактерий достоверно не отличалась и находилась в диапазоне  $0,011 - 0,013 \text{ ч}^{-1}$ , валовая скорость синтеза БЦ достигала максимума на 6 сутки и составила  $0,07 - 0,09 \text{ г/ч}$ . Выход БЦ с единицы затраченного субстрата был выше на не очищенном глицерине и составил  $0,76 \text{ г/г}$ .

2) Тест на биосовместимость показал безопасность полученных мембран для клеток млекопитающих, что позволяет рекомендовать БЦ в качестве перспективного материала для регенерации кожных ран.

3) Исследована кинетика оттока антисептиков мирамистина и хлоргексидина. Установлено, что БЦ может выступать в качестве носителя лекарственных препаратов на свойства, которого можно влиять, меняя режим сушки. Полученные композиты продемонстрировали свою эффективность против бактерий *S. aureus* (15mm), *P. aeruginosa* (13 mm) и *E.coli* (12 mm).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Козка.А, Олифирова О. Ожоговая травма. 2021. 1–85 p.
2. Laavanya D., Shirkole S., Balasubramanian P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation // J. Clean. Prod. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 295. P. 126454.
3. Tsouko E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams // Int. J. Mol. Sci. 2015. Vol. 16, № 7. P. 14832–14849.
4. Zikmanis P. et al. Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives // Bioresour. Bioprocess. Springer Singapore, 2021. Vol. 8, № 1. P. 1–14.
5. Volova T.G. et al. Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068 // Appl. Microbiol. Biotechnol. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. Vol. 102, № 17. P. 7417–7428.
6. Ullah M.W. et al. Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose // Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials. 2019. № March. 81–114 p.
7. Chawla P.R. et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications // Food Technol. Biotechnol. 2009. Vol. 47, № 2. P. 107–124.
8. Богатырева А. Оптимизация условий биосинтеза бактериальной целлюлозы.pdf. 2021.
9. Bodea I.M. et al. Optimization of moist and oven-dried bacterial cellulose production for functional properties // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13, № 13. P.

1–25.

10. Hassan E. et al. The Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under Optimized Fermentation Conditions // *Br. Microbiol. Res. J.* 2015. Vol. 9, № 3. P. 1–13.
11. Matsutani M. et al. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99, № 17. P. 7229–7240.
12. Torgbo S., Sukyai P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering // *Appl. Mater. Today.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 11. P. 34–49.
13. Wahid F. et al. Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications // *Biotechnol. Adv.* Elsevier Inc., 2021. Vol. 53, № October. P. 107856.
14. Swingler S. et al. The mould war: Developing an armamentarium against fungal pathogens utilising thymoquinone, ocimene, and miramistin within bacterial cellulose matrices // *Materials (Basel).* 2021. Vol. 14, № 10.
15. Dydak K. et al. In vitro efficacy of bacterial cellulose dressings chemisorbed with antiseptics against biofilm formed by pathogens isolated from chronic wounds // *International Journal of Molecular Sciences.* 2021. Vol. 22, № 8.
16. Inoue B.S. et al. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 148. P. 1098–1108.
17. Bodea I.M. et al. Antimicrobial Properties of Bacterial Cellulose Films Enriched with Bioactive Herbal Extracts Obtained by Microwave-Assisted Extraction // *Polymers (Basel).* 2022. Vol. 14, № 7.
18. Garcia E.L. et al. Enhanced Antimicrobial Activity of Biocompatible Bacterial Cellulose Films via Dual Synergistic Action of Curcumin and Triangular Silver

Nanoplates // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 20.

19. Costa-Gutierrez S.B. et al. Glycerol as a substrate for actinobacteria of biotechnological interest: Advantages and perspectives in circular economy systems // *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 279. P. 130505.
20. Caro-astorga J., Lee K., Ellis T. Increasing bacterial cellulose compression resilience with glycerol or PEG400 for robust engineered living materials . // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* Elsevier Ltd, 2022. Vol. 4, № September. P. 100245.
21. Ho Jin Y. et al. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus* // *J. Ind. Eng. Chem. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 2019. Vol. 75. P. 158–163.
22. Dikshit P.K., Kim B.S. Bacterial cellulose production from biodiesel–derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V, 2020. Vol. 153. P. 902–911.
23. Agustin Y.E. et al. Glycerol as an additional carbon source for bacterial cellulose synthesis // *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2018. Vol. 141, № 1.
24. Химическая продукция для различных отраслей промышленности | АКРИХИМФАРМ [Electronic resource]. URL: <https://akrihim.ru/> (accessed: 20.04.2024).
25. Dash S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 2010. Vol. 67, № 3. P. 217–223.
26. Siepmann J., Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol.

48, № 2–3. P. 139–157.

27. Dutch Glycerin Refinery. Глицерин очищенный Нидерланды.PDF. 2017.
28. COMERCIA P., LTDA E.D.O. Глицерин натур сертификат. 2017.
29. СИМОНОВ О.А., ОЛЕГОВНА С.Е., АЛЕКСЕЕВИЧ М.В. Способ оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии. 2016. Vol. 396, № 19. P. 1–10.
30. Maier R.M. Bacterial Growth // Environmental Microbiology. Second Edi. Elsevier Inc., 2009. P. 37–54.
31. Fromm-Dornieden C. et al. Cetylpyridinium chloride and miramistin as antiseptic substances in chronic wound management – Prospects and limitations // J. Med. Microbiol. 2015. Vol. 64, № 4. P. 407–414.
32. Osmanov A. et al. The antiseptic Miramistin: A review of its comparative in vitro and clinical activity // FEMS Microbiol. Rev. 2020. Vol. 44, № 4. P. 399–417.
33. Rodgers N., Murdaugh A. Chlorhexidine-induced elastic and adhesive changes of Escherichia coli cells within a biofilm // Biointerphases. 2016. Vol. 11, № 3.
34. Adepu S., Khandelwal M. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism // Carbohydr. Polym. Elsevier, 2020. Vol. 249, № February. P. 116816.
35. Fijałkowski K. et al. Effect of Gluconacetobacter xylinus cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose // Polish J. Chem. Technol. 2016. Vol. 18, № 4. P. 117–123.
36. Avirasdya R.A. et al. Kinetics study of bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum FNCC 0001 with variation of carbon sources // E3S Web Conf. 2022. Vol. 344, № March.
37. Li Z. et al. Effect of ph buffer and carbon metabolism on the yield and mechanical

properties of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* atcc 53582 // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. Vol. 31, № 3. P. 429–438.

38. Gayathri G., Srinikethan G. Crude glycerol as a cost-effective carbon source for the production of cellulose by *K. saccharivorans* // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 16. P. 326–330.
39. Basu P. et al. Biocompatibility and biological efficiency of inorganic calcium filled bacterial cellulose based hydrogel scaffolds for bone bioengineering // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 1–16.
40. Orlando I. et al. Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8, № September. P. 1–19.
41. Luo H. et al. Fabrication of a novel hierarchical fibrous scaffold for breast cancer cell culture // *Polym. Test.* 2019. Vol. 80, № July.
42. Olyveira G.M. et al. Human dental pulp stem cell behavior using natural nanolith/bacterial cellulose scaffolds for regenerative medicine // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2013. Vol. 9, № 8. P. 1370–1377.
43. Montrezor L.H. et al. The influence of chitosan, cellulose and alginate chemical nature on mineral matrix formation // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* Taylor & Francis, 2022. Vol. 71, № 12. P. 875–885.
44. Coelho F. et al. Bacterial cellulose membrane functionalized with hydroxiapatite and anti-bone morphogenetic protein 2: A promising material for bone regeneration // *PLoS One.* 2019. Vol. 14, № 8. P. 1–23.
45. Jantarat C. et al. Comparison of drug release behavior of bacterial cellulose loaded with ibuprofen and propranolol hydrochloride // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry*, 2021. Vol. 11, № 59. P. 37354–37365.



46. Popa L. et al. Antibacterial Activity of Bacterial Cellulose Loaded // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 18. P. 4069.
47. Ye S. et al. Morphological, release and antibacterial performances of amoxicillin-loaded cellulose aerogels // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 8.
48. Merchant H.A. et al. Once-daily tablet formulation and in vitro release evaluation of cefpodoxime using hydroxypropyl methylcellulose: A technical note // *AAPS PharmSciTech*. 2006. Vol. 7, № 3. P. 3–8.
49. Wójcik-Pastuszka D. et al. Evaluation of the release kinetics of a pharmacologically active substance from model intra-articular implants replacing the cruciate ligaments of the knee // *Materials (Basel)*. 2019. Vol. 12, № 8.
50. Ankush P., Shweta S. Engineering design and mechanistic mathematical models. 2018.
51. Krasowski G. et al. Potential of novel bacterial cellulose dressings chemisorbed with antiseptics for the treatment of oral biofilm infections // *Appl. Sci*. 2019. Vol. 9, № 24.
52. Tarawneh O. et al. Characterization of Chlorhexidine-Impregnated Cellulose-Based Hydrogel Films Intended for the Treatment of Periodontitis // *Biomed Res. Int*. 2021. Vol. 2021.
53. Liu Y. et al. Structure and properties of microcellulose-based coatings deposited via a low-energy electron beam and their effect on the properties of onto wound dressings // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl. Elsevier Ltd*, 2021. Vol. 2. P. 100146.



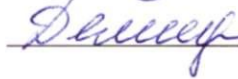
Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

Утверждаю  
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова  
« 24 » июля 2024 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**  
**Бактериальная целлюлоза как носитель лекарственных веществ:**  
**биосинтез, депонирование, характеристика**

06.04.01 – Биология  
06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель		доцент, канд. техн. наук	Е.Г. Киселев
Выпускник			М.П. Ортис
Рецензент		доцент, канд. техн. наук	Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2024