

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

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Микробиологический синтез экзополисахаридов и их использование в составе
композитных материалов для разработки систем доставки лекарственных
средств

Руководитель _____ доцент, к.б.н., Н.О. Жила
подпись

Магистрант _____ Я.В. Филиппова
подпись

Рецензент _____ н.с., к.б.н., А.В. Муруева
подпись

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Микробиологический синтез экзополисахаридов и их использование в составе композитных материалов для разработки систем доставки лекарственных средств» содержит 61 страницу текстового документа, 107 использованных источников, 7 таблиц, 1 формулу и 8 рисунков.

Ключевые слова: экзополисахариды, *Agrobacterium tumefaciens*, полимер, полигидроксиалканоаты, поли(3-гидроксибутират), условия культивирования, система доставки лекарственных средств, композитные материалы, композиты.

Целью данной работы являлось исследование микробиологического синтеза экзополисахаридов и их использование при создании композитных материалов для систем доставки лекарственных средств.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние состава питательной среды на продукцию экзополисахаридов у бактерий *Agrobacterium tumefaciens*;
2. С использованием эмульсионного метода изготовить микрочастицы на основе поли(3-гидроксибутирата) и экзополисахаридов, исследовать их свойства;
3. Получить микрочастицы на основе поли(3-гидроксибутирата) и композитные микрочастицы с ЭПС, нагруженные антибактериальным препаратом, исследовать их свойства и динамику высвобождения данного препарата *in vitro*;
4. Оценить лекарственную эффективность полученных микрочастиц, нагруженных антибактериальным препаратом, на примере модельных микроорганизмов – грамположительных *Micrococcus luteus* и грамотрицательных *Cupriavidus necator* В-10646.

Актуальность данной работы заключается в нижеследующем.

В мире всё большее значение приобретают экологичные материалы, получаемые из природного сырья или синтезируемые микроорганизмами, так

называемые биополимеры. Примерами таких биоматериалов бактериального происхождения являются полигидроксиалканоаты и экзополисахариды. Они обладают множеством уникальных полезных свойств, в частности высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью, благодаря которым они используются в биомедицине и перспективны, как носители, в системах доставки лекарственных средств. Создание композитных материалов на основе данных полимеров позволило бы улучшить эксплуатационные и технологические характеристики будущих носителей лекарственных средств, поэтому разработка композитных микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов является актуальной темой исследования.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1 Классификация и структура полисахаридов	8
1.2 Общая характеристика экзополисахаридов	9
1.3 Биосинтез экзополисахаридов	12
1.4 Продуценты экзополисахаридов. Особенности культивирования	13
1.5 Системы доставки лекарственных средств	19
1.5.1 Экзополисахариды в качестве материала для биомедицины и фармакологии	20
1.6 Композитные материалы на основе биополимеров и экзополисахаридов	21
1.6.1 Композитные материалы на основе биополимеров и экзополисахаридов для создания систем доставки лекарственных средств	23
Глава 2. Материалы и методы.....	25
2.1 Культивирование <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.2 Подготовка инокулята	26
2.3 Получение экзополисахаридов	27
2.4 Изготовление микрочастиц и композитных микрочастиц на основе экзополисахаридов и полигидроксиалканоатов	27
2.5 Изготовление композитных микрочастиц нагруженных лекарственным препаратом.....	29
2.6 Характеристика микрочастиц	31
2.7 Высвобождение лекарственного препарата <i>in vitro</i>	31
2.8 Антимикробная активность	32
2.9 Статистическая обработка данных.....	33
Глава 3. Результаты.....	34
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	48

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49
--	----

ВВЕДЕНИЕ

В мире все большее значение приобретают экологичные материалы, получаемые из природного сырья или синтезируемые микроорганизмами. Такими экологичными материалами являются биodeградируемые природные полимеры, которые отличаются от популярных пластиков, полученных из нефтехимического сырья, возможностью разложения в природной среде естественным путем до безвредных продуктов [1].

Среди различных групп биополимеров (полилактиды, полигликолиды, полисахариды и др.) несомненного внимания заслуживают полигидроксиалканоаты (ПГА). Полигидроксиалканоаты представляют собой нерастворимые в воде соединения, которые синтезируются различными микроорганизмами в виде гранул внутри клетки. ПГА обладают такими свойствами как биосовместимость, биоразлагаемость, термопластичность и находят широкое применение в сельском хозяйстве, медицине и других областях промышленности [2, 3].

Также, в последние годы возрастает роль бактериальных экзополисахаридов (ЭПС). Значительный интерес уделяется поиску, исследованию экзополисахаридов и их продуцентов, а также практическому использованию данных биополимеров [4-8]. Экзополисахариды отличаются большим разнообразием структурных комбинаций, поддающихся модификациям, тем самым обуславливая уникальные характеристики полимера. Благодаря широкому спектру физико-химических, биологических и функционально-технологических свойств, им находят широкое коммерческое применение в различных отраслях промышленности [9, 10].

Экзополисахариды обладают множеством уникальных полезных свойств, таких как биосовместимость, биоразлагаемость, способность к гелеобразованию, высокая адгезионная способность [11]. Кроме того, некоторые ЭПС обладают противоопухолевой [12-15], антиоксидантной [15, 16], противовоспалительной, антибактериальной, противовирусной,

пребиотической [17], ранозаживляющей и иммуномодулирующей активностью [18]. Биосовместимость и функциональные свойства ЭПС являются важными факторами, способствующими их использованию в различных отраслях медицины [19], например, в тканевой инженерии [20, 21] или при разработке системы доставки лекарственных средств [22, 23]. ЭПС являются потенциальными носителями ценных лекарственных средств, включая факторы роста и противоопухолевые препараты [24-26]. Помимо этого, ЭПС привлекают особое внимание как биополимеры для производства новых биокompозитных материалов широкого спектра применения [11, 27-29].

Целью данной работы являлось исследование микробиологического синтеза экзополисахаридов и их использование при создании композитных материалов для систем доставки лекарственных средств.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

5. Исследовать влияние состава питательной среды на продукцию экзополисахаридов у бактерий *Agrobacterium tumefaciens*;
6. С использованием эмульсионного метода изготовить микрочастицы на основе поли(3-гидроксibuтирата) и экзополисахаридов, исследовать их свойства;
7. Получить микрочастицы на основе поли(3-гидроксibuтирата) и композитные микрочастицы с ЭПС, нагруженные антибактериальным препаратом, исследовать их свойства и динамику высвобождения данного препарата *in vitro*;
8. Оценить лекарственную эффективность полученных микрочастиц, нагруженных антибактериальным препаратом, на примере модельных микроорганизмов – грамположительных *Micrococcus luteus* и грамотрицательных *Cupriavidus necator* B-10646.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Классификация и структура полисахаридов

Полисахариды микроорганизмов (ПСМ) – сложные высокомолекулярные соединения. Одни из них являются чистыми полисахаридами (ПС), другие – комплексами, содержащими помимо углеводов липиды и белки. По морфологической локализации ПСМ делятся на три основные группы: внеклеточные (экзополисахариды), ПС клеточной оболочки и внутриклеточные [30].

Полисахариды – высокополимерные углеводы (поликонденсаты), построенные из остатков моносахаридов и (или) их производных. Число моносахаридных звеньев в ПС колеблется в широких пределах, а молекулярные массы ПС составляют от нескольких тысяч до миллионов дальтон [30].

В соответствии с их химическим составом ЭПС делятся на группы:

I. Гомополисахариды (гомогликаны) – полимеры, состоящие из остатков одного типа моносахарида [30 книга]. Данные гомополисахариды объединяют в четыре группы: α -D-глюканы (например, альтернан, декстран), β -D-глюканы (например, бактериальная целлюлоза), фруктаны (например, инулин и леван) и полигалактаны. Мономеры, как правило, связаны β -1,4 или β -1,3 и α -1,2 или α -1,6 связями. Первые перечисленные наделяют полимеры свойствами жесткости, вторые обеспечивают гибкость молекул [31].

II. Гетерополисахариды (гетерогликаны) – сополимеры, в состав которых входят различные моносахариды и их производные [30]. Гетерополисахариды обычно состоят из 3–8 единиц глюкозы, галактозы или рамнозы. Однако они могут содержать и другие моносахариды, включая арабинозу, фруктозу, маннозу, фукозу, глюкуроновую кислоту и N-ацетилглюкозиды, а также, специфичные модификации, которые содержат ацетильные и фосфатные группы [27, 32]. Примеры гетерополисахаридов: геллан, кефиран и ксантан [33].

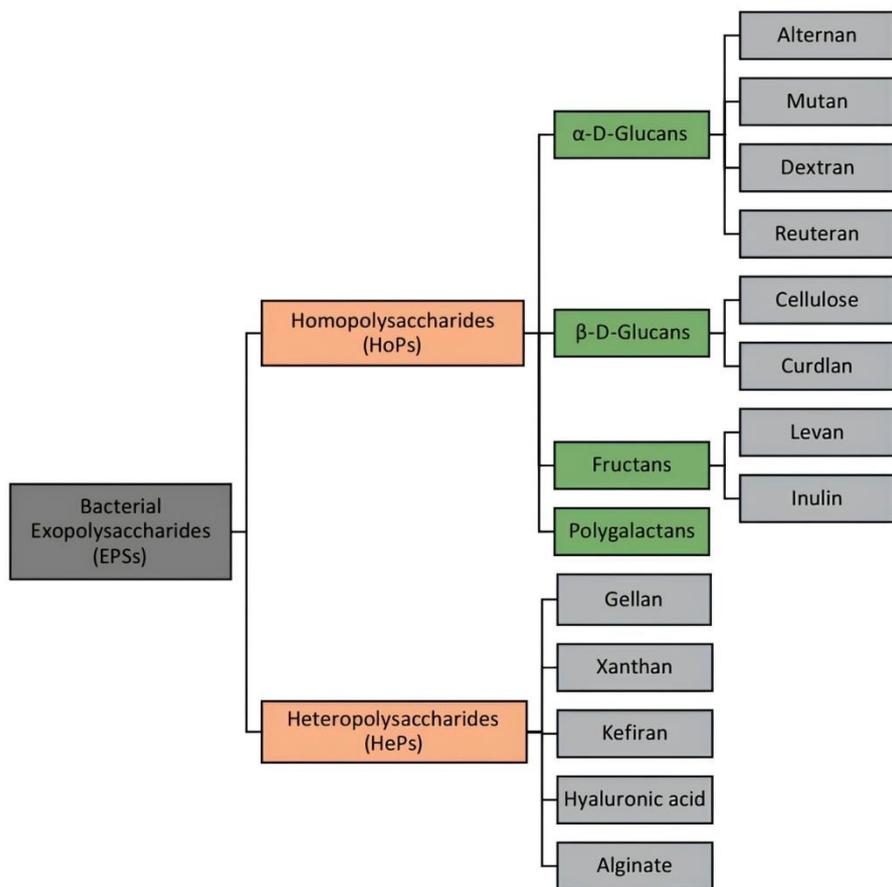


Рисунок 1 – классификация экзополисахаридов [34]

Из-за перечисленных различий размерный профиль каждого типа ЭПС может сильно варьироваться: молекулярная масса гомополисахаридов находится в диапазоне от 10 кДа до 6000 кДа, в то время как молекулярная масса гетерополисахаридов разнится от 10 кДа до 10 000 кДа [33].

1.2 Общая характеристика экзополисахаридов

Термин «экзопполисахариды» был впервые введен И.В. Сазерлендом в 1972 году [35] для обозначения высокомолекулярных углеводных биополимеров, продуцируемых микроорганизмами. В середине 19 века Луи Пастер впервые открыл бактериальный экзополисахарид – декстран, основным компонентом которого являлась глюкоза. С тех пор выдающимися учеными было открыто множество бактериальных экзополисахаридов, таких как целлюлоза, альгинат, ксантан, которые нашли свое применение, что сделало их коммерчески важными продуктами в современных реалиях [36].

Бактериальные ЭПС имеют множество различных структур и секретируются широким спектром микроорганизмов [37]. ЭПС делятся на капсульные полисахариды, тесно связанные с поверхностью клетки, и свободные полисахариды слизи, слабо прикрепленные или даже полностью секретируемые во внеклеточную среду, такие ЭПС могут быть легко удалены с поверхности клетки [38, 39].

Биологическая роль бактериальных ЭПС также разнообразна. Они защищают клетки от экстремальных температур [40, 41], засушливости [42], УФ-лучей, неблагоприятных значений pH, осмотического стресса [43], химических агентов (антибиотиков, тяжелых металлов и оксидантов), фагоцитоза и атаки бактериофагов (препятствуют их адсорбции). Морские бактерии секретируют полисахариды, которые необходимы для их выживания в морской среде [40]. ЭПС оказывают криопротекторное действие, в частности, в отношении арктических бактерий [41]. Вид бактерий *Zymomonas mobilis*, производящих биоэтанол, способен расти на средах с концентрацией спирта до 16%, что также можно объяснить защитным действием ЭПС [44]. ЭПС играют важную роль в адгезии, агрегации и образовании биопленок бактерий и являются основной фракцией матрикса биопленок как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий [45-47]. ЭПС матрикса биопленки способствуют горизонтальному переносу генов, а межклеточные взаимодействия предотвращают обезвоживание бактерий и обеспечивают защиту от внешних агентов, включая антибиотики. ЭПС играет важную роль в контроле вирулентности не только патогенов человека, но и растений. Ксантан, продуцируемый фитопатогенными бактериями *Xanthomonas spp.* является одним из факторов вирулентности, участвующих в специфическом взаимодействии бактерий с растением [48, 49].

Экзополисахариды являются вторичными метаболитами, синтезируются на протяжении всей логарифмической, поздней логарифмической или стационарной фазы. Выход максимальной продукции происходит в поздней

логарифмической фазе [50]. Количество выделяемого ЭПС зависит от штаммов, состава среды и условий культивирования, таких как рН среды, температура и соотношение углерода с азотом. Различные моносахаридные композиции, связи, заряды, наличие повторяющихся боковых цепей и замены приводят к образованию большого количества различных типов ЭПС [51].

Бактериальные ЭПС обладают множеством уникальных полезных свойств, таких как биосовместимость, биоразлагаемость, нетоксичность, способность к гелеобразованию, высокая адгезионная способность [11]. Как упоминалось ранее, ЭПС продемонстрировали способность противостоять различным воздействиям окружающей среды (повышенная/пониженная температура, экстремальный уровень рН, и высокие концентрации солей). Поэтому им находят широкое коммерческое применение в пищевой, фармацевтической, косметической, химической, текстильной, нефтегазовой промышленности в качестве загустителей, эмульгаторов и стабилизаторов суспензии, флокулянтов и добавок, улучшающих качество различных продуктов [52]. Кроме того, некоторые бактериальные ЭПС также обладают противоопухолевой [12-15], антиоксидантной [15, 16], противовоспалительной, антибактериальной, противовирусной, гипохолестеринемической, пребиотической [17], ранозаживляющей и иммуномодулирующей активностью [18]. Показано, что ЭПС, продуцируемые *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus rhamnosus*, обладают противоопухолевой и антиоксидантной активностью [53, 54]. ЭПС штаммов *Lactobacillus* обладают способностью стимулировать врожденный иммунный ответ, а ЭПС *Lactobacillus plantarum* JLK0142, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus johnsonii* 142 и *Bifidobacterium sp.* обладают значительной иммуномодулирующей активностью [55, 56]. Биосовместимость и функциональные свойства ЭПС являются важными факторами, способствующими их использованию в различных отраслях медицины [19], например, в тканевой инженерии [20, 21] или при разработке системы доставки

лекарственных средств [22, 23]. ЭПС являются потенциальными носителями ценных лекарственных средств, включая факторы роста и противоопухолевые препараты [24-26]. На данный момент, в качестве модели системы доставки лекарственных средств с помощью бактериальных ЭПС широко используются антибиотики. Помимо этого, ЭПС привлекают особое внимание как биополимеры для производства новых биокompозитных материалов широкого спектра использования. Композитам на основе ЭПС можно придавать антибактериальные, ранозаживляющие, проводящие, магнитные, оптические и другие свойства [11, 27-29]. Недавно получены новые бактериальные полисахариды для лечения болезни Альцгеймера [57] и диабета [23]. ЭПС также можно использовать для очистки сточных вод от тяжелых металлов и органических загрязнителей, включая красители, фармацевтические соединения и нефтепродукты [58, 59].

1.3 Биосинтез экзополисахаридов

Биосинтез экзополисахаридов у бактерий может происходить, как внутриклеточно, так и внеклеточно. Существует четыре основных механизма биосинтеза ЭПС в бактериальных клетках: Wzx/Wzy-зависимый путь, ABC-зависимый путь, синтазо-зависимый путь и внеклеточный биосинтез с помощью ферментов [60]. Биосинтез гомополисахаридов обычно происходит при синтазо-зависимом или внеклеточном пути, тогда как гетерополисахариды синтезируются с помощью Wzx/Wzy-зависимого или ABC-зависимого пути [60].

При внеклеточном биосинтезе экзополисахариды производятся при помощи внеклеточных ферментов – гликансахараз (гликозилтрансфераза и фруктозилтрансфераза). Остатки сахара расщепляются на мономерные единицы вне клетки и там же собираются в полимер. В качестве специфического субстрата используется сахароза, которая расщепляется на глюкозу и фруктозу [33]. Впоследствии из мономеров глюкозы строятся: декстран, мутан, альтернан, курдлан, из мономеров фруктозы – леван [60].

При внутриклеточном биосинтезе остатки сахаров транспортируются в клетку, превращаются в различные мономерные единицы, частично полимеризуются и прикрепляются к мембраносвязанному изопреноидному липидному переносчику. На этом этапе происходит необходимая модификация полимера, после чего полимер транспортируется наружу [33].

Геллан, ксантан и кефиран – экзополисахариды, синтезированные Wzx/Wzy-зависимым путем [60].

Данный путь в основном участвует в синтезе капсульных полисахаридов [60].

Примером полимера, синтезированного по синтазо-зависимому пути, является бактериальная целлюлоза [60]. Синтез и транспорт целлюлозы через внутреннюю мембрану бактерий осуществляется комплексом из интегрированной в мембрану каталитической субъединицы *VcsA* и закрепленного на мембране периплазматического белка *VcsB*. Сборка единиц УДФ-глюкозы происходит посредством *VcsA* [62].

1.4 Продуценты экзополисахаридов. Особенности культивирования

Бактерии-продуценты ЭПС принадлежат к разным филогенетическим группам и включают грамотрицательные бактерии таких классов, как *Alphaproteobacteria*, включая рода *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* и *Zymomonas*; класс *Betaproteobacteria*, включая рода *Alcaligenes* и *Achromobacter*; и класс *Gammaaproteobacteria*, включающий рода *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Xanthomonas*, *Halomonas*, *Erwinia*, *Vibrio* и *Klebsiella*. Из грамположительных бактерий такие классы, как *Bacilli*, включая рода *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Streptococcus*; класс *Clostridia*, род *Sarcina* sp.; и класс *Actinomycetia*, включая рода *Bifidobacterium*, *Rhodococcus* и другие [63].

Некоторые из наиболее часто используемых ЭПС: ксантан, синтезируемый бактериями *Xanthomonas*, декстран – *Leuconostoc*, *Streptococcus*

и *Lactobacillus*, альгинат – *Azotobacter* и *Pseudomonas*, курдлан – *Alcaligenes faecalis*, *Rhizobium radiobacter* и *Agrobacterium sp.*, геллан *Sphingomonas* и *Pseudomonas*, гиалуронат – *Streptococcus sp.*, леван – *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Halomonas sp.* и *Zymomonas sp.*, бактериальная целлюлоза – *Komagataeibacter sp.*, кефирин – *Lactobacillus kefiranofaciens* и другие [63].

На данный момент существует множество вариаций получения экзополисахаридов из различных видов микроорганизмов: дрожжей и других грибов, а также бактерий. Чаще всего в работе используются пробиотические бактерии из-за их непатогенности и доступности. Выход биополимеров у разных продуцентов сильно отличается в зависимости от условий их культивирования.

На выход и состав ЭПС огромное влияние оказывает используемый источник углерода. Штаммы, продуцирующие ЭПС, способны расти на самых разных источниках углерода, включая сахарозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, лактозу, мальтозу и маннозу, а также на средах на основе молочных продуктов, мелассы и крахмала [63]. Изучение 20-и штаммов *Lactobacillus paracasei* показало, что изменение источника углерода не только увеличивает выход ЭПС, но и влияет на состав моносахаридов. На выход и состав ЭПС огромное влияние оказывает используемый источник углерода. Штаммы, продуцирующие ЭПС, способны расти на самых разных источниках углерода, включая сахарозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, лактозу, мальтозу и маннозу, а также на средах на основе молочных продуктов, мелассы и крахмала [63]. Изучение 20-и штаммов *Lactobacillus paracasei* показало, что изменение источника углерода не только увеличивает выход ЭПС, но и влияет на состав моносахаридов. На выход и состав ЭПС огромное влияние оказывает используемый источник углерода. Штаммы, продуцирующие ЭПС, способны расти на самых разных источниках углерода, включая сахарозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, лактозу, мальтозу и маннозу, а также на средах на основе молочных продуктов, мелассы и крахмала [63]. Изучение 20-и штаммов

Lactobacillus paracasei показало, что изменение источника углерода не только увеличивает выход ЭПС, но и влияет на состав моносахаридов. На выход и состав ЭПС огромное влияние оказывает используемый источник углерода. Штаммы, продуцирующие ЭПС, способны расти на самых разных источниках углерода, включая сахарозу, глюкозу.

Выход ЭПС был увеличен на 115%, когда исследователями были подобраны оптимальные концентрации фруктозы, глюкозы, галактозы, лактозы, маннозы и трегалозы [64]. При выращивании *Candida guilliermondii* и *Candida famata* среди различных источников углерода, включая сахарозу, мальтозу, лактозу, глицерин и сорбит, максимальная продукция ЭПС ($2,98 \pm 0,39$ г/л) была достигнута при использовании мальтозы (5% концентрации) на 72 час культивирования [65]. Т.З. Ха, А.В. Канарский и др. [66] выращивали *Paenibacillus mucilaginosus* 574 при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$, pH среды $6,0 \pm 0,2$ с использованием 2% экстракта мелассы и добавлением 0,1% кукурузного экстракта без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Максимальная концентрация ЭПС, которая была получена с внесением 5% инокулята после 24 ч инокуляции при отношении объема воздуха к объему среды 4:1, составила 9,55 г/л (количество ЭПС определяли гравиметрическим методом).

Использование коммерческих сахаров/субстратов напрямую влияет на себестоимость продукции и является одним из факторов, отвечающих за высокие производственные затраты. Следовательно, недорогие отходы, такие как лигноцеллюлозные остатки и сточные воды, являются предпочтительными в качестве сырья для производства экзополисахаридов. Углеводы и органические фракции, присутствующие в отходах, могут быть использованы микроорганизмами. Это открывает возможность снижения себестоимости продукции, а также управления отходами. Чой и соавт. [67] использовали сточные воды, полученные в результате ферментации кимчи, для производства ЭПС с использованием бактерии *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32. В

оптимальных условиях максимальный выход ЭПС составил 7,7–9,0 г/л. Экзополисахариды были нетоксичны, проявляли термостойкость и антиоксидантную активность. *Sphingobium yanoikuyae* оценивали на совместное производство экзополисахаридов и полигидроксиалканоатов с использованием лигноцеллюлозного гидролизата. Гидроксиметилфурфурол, один из побочных продуктов гидролиза, улучшал потребление глюкозы и ксилозы во время ферментации [68].

Температура и рН

Синтез экзополисахаридов сильно зависит от условий культивирования, рН и температуры. По литературным данным, при значениях рН от 5 до 7 выход экзополисахаридов является наибольшим [69-73]. Также было обнаружено, что более высокий выход ЭПС связан с условиями культивирования, в которых водородный показатель взят под постоянный контроль [31]. Зису Б. и Шах Н.П. [71] получили 1029 мг/л ЭПС из *S. thermophilus* через 24 часа при постоянной поддержке рН в районе 5,5, при аналогичной ферментации без контроля рН было получено 491 мг/л ЭПС. Наблюдалось, что при температурах, неоптимальных для роста бактерий выход ЭПС становился выше [31], например, у бактерий *L. Lactis*, *L. rhamnosus* и *L. plantarum* оптимальный температурный диапазон для синтеза ЭПС составляет от 18 до 25°C [74-76], у *S. thermophilus* – от 32 до 42°C [71, 77].

Важным способом увеличения выхода ЭПС, получаемого в процессе ферментации, является ингибирование деградации ЭПС. Температура и рН являются важными факторами, влияющими на деградацию ЭПС, вызванную ферментативной активностью [77, 78]. Были проведены исследования, в которых активность ферментов останавливали в конце ферментации путем повышения температуры с 42°C до 90°C или подкисления среды рН от 6 до 3. В ходе исследования, изменения рН и температуры не привели к заметному ухудшению выхода ЭПС с течением времени, тогда как контрольные образцы с поддерживаемой температурой и рН на уровне 42°C и 6,2, соответственно,

показали явное снижение ЭПС [78]. Данный эксперимент показывает, что остановка активности действия ферментов в конце ферментации является полезным методом сохранения выхода ЭПС.

Источники азота

В качестве источников азота для роста микроорганизмов могут быть использованы дрожжевой экстракт, пептон, триптон, пептон казеинового или мясного экстракта [31].

Как упоминалось выше, производство ЭПС поддерживают несколько источников азота, однако в литературе, наиболее широко используется дрожжевой экстракт, обеспечивающий самые высокие урожаи [79-81]. Дрожжевой экстракт дает дополнительные преимущества по сравнению с другими источниками, поскольку уже содержит достаточное количество витаминов для поддержания роста бактерий [79-81]. Некоторые исследования указывают на эффект ингибирования выработки ЭПС из-за избытка азота в ферментационном бульоне при использовании концентраций дрожжевого экстракта выше 56 г/л [82, 83].

Необходимость правильного азотистого баланса была подчеркнута в исследовании Шене и соавторов (2008) [82], которые поставили эксперимент, с концентрацией азота, варьирующейся на +/- 50% от базовой концентрации 25 г/л. Среда содержала лактозу, дрожжевой экстракт, полипептон, сульфат марганца(II) и сульфат магния. Увеличение концентрации азота не повлияло на выход ЭПС, тогда как снижение концентрации азота привело к снижению конечного выхода ЭПС на 50%.

Аминокислоты, соли и витамины

Аминокислоты не принимают непосредственного участия в синтезе ЭПС, но все же могут служить источниками углерода и азота в питательной среде [78]. Например, ни для бактерий *S. thermophilus*, ни для *L. rhamnosus* не было выявлено, что добавление аминокислот в питательную среду увеличивает выход ЭПС, у *L. delbrueckii ssp bulgaricus* отсутствие незаменимых

аминокислот не снижает выход ЭПС [78, 79, 84]. Маседо и соавт. (2002) сообщили, что добавление дополнительных аминокислот и солей к среде на основе сыворотки и дрожжевого экстракта приводит к высокому выходу ЭПС – 2775 мг/л [79]. Добавление очищенных аминокислот в ферментационный бульон очень дорого для промышленного масштабирования и нежелательно в пищевой промышленности [79].

Добавление различных солей также может увеличивать рост микроорганизмов, тем самым повышая выработку ЭПС [116,118]. Mn^{2+} и Mg^{2+} являются важными факторами роста лактобактерий, было показано, что эти два микроэлемента увеличивают выход ЭПС [85]. Mg^{2+} является незаменимым минералом, поскольку он влияет на активность фосфоглюкомутазы, важного фермента, участвующего в биосинтезе ЭПС [79]. Mn^{2+} нужно добавлять в среду, только при его пониженных концентрациях в ней, повышенное присутствие Mn^{2+} не приводит к увеличению выхода ЭПС [86]. Добавление раствора солей ($C_2H_3O_2Na$, $C_6H_{17}N_3O_7$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и $MnSO_4 \cdot 2H_2O$) к среде на основе сыворотки и дрожжевого экстракта значительно увеличило выход ЭПС у *L. rhamnosus* с 438 мг/л до 1673 мг/л [79]. Аналогичные результаты были получены при культивировании *L. kefiranofaciens*, где добавление $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3$ и KH_2PO_4 приводило к увеличению выхода ЭПС, при этом $FeCl_3$ вызывал наибольший прирост продукции [87].

Чтобы исследовать влияние определенных витаминов на рост бактерий *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, было проведено тестирование, по которому несколько витаминов поочередно добавляли в питательную среду. Только рибофлавин, кальция пантотенат и никотиновая кислота оказались необходимы для роста [79]. При исключении из среды сразу нескольких витаминов, за исключением вышеперечисленных, было обнаружено снижение роста *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, но при значительном увеличении продукции ЭПС [79]. Другое исследование не обнаружило увеличения выхода ЭПС при культивировании *L.*

rhamnosus с добавлением витаминов в среду, на основе сыворотки и дрожжевого экстракта, возможно, из-за достаточного количества витаминов, уже присутствующих в дрожжевом экстракте [79]. Специальное добавление витаминов в питательную среду может быть дорогостоящим при производстве ЭПС в больших масштабах.

1.5 Системы доставки лекарственных средств

За последние десятилетия фармацевтические, биотехнологические и медицинские компании пытались разработать системы введения лекарственных средств, позволяющие улучшить терапевтический эффект препаратов и увеличить период их полураспада, не вызывая побочных эффектов. По этой причине были разработаны системы доставки лекарственных средств (СДЛС) [88].

Как правило, СДЛС состоят из носителя и лекарственного средства, которое необходимо доставить. Носителем обычно является биоразлагаемый, биосовместимый полимер, синтетического или природного происхождения, который препятствует быстрой деградации лекарства в организме человека. Разработаны различные формы носителей и конструкции для доставки лекарственных средств в орган и ткань-мишень, среди них: гидрогели, микросферы, наночастицы, липосомы, скаффолды, пролекарства. По способу введения СДЛС классифицируются на буккальные, пероральные, ректальные, парентеральные, имплантируемые [36].

Наиболее важным аспектом в создании носителя для доставки лекарств является его способность достигать целевого участка с последующим контролируемым высвобождением препарата, тем самым повышая эффективность доставляемого фармацевтического вещества. Кроме того, стоит учитывать скорость высвобождения молекул лекарственного вещества из полимерного носителя и время, необходимое для достижения целевого участка [36]. Выбор носителя также является ключевым параметром для управления механизмом последующего высвобождения: лекарство диффундирует из

полимера и/или полимер набухает, улучшая высвобождение лекарства, или лекарство может высвободиться за счет двойного механизма эрозии-диффузии [89].

Еще одним параметром, характеризующим СДЛС является размер частиц. Для доставки лекарства в легкие требуется размер микрочастиц в районе 1–5 микрон, для обеспечения правильного осаждения в альвеолах и дыхательных путях [90, 91]. Аналогично, для интраназального введения лекарственных средств требуются частицы размером от 8 до 20 микрон. Для трансдермальной доставки лекарств в слои кожи требуются частицы размером 10-600 нм, тогда как для внутривенного введения – от 200 нм до 2 микрон [90, 91].

1.5.1 Экзополисахариды в качестве материала для биомедицины и фармакологии

Хотя химически синтезированные полимеры, например на акриловой основе, широко обсуждаются, в опубликованных научных работах, биоразлагаемые бактериальные полимеры могут стать гораздо лучшей и более безопасной альтернативой. Благодаря своей распространенности в природе, биосовместимости, биоразлагаемости, нетоксичности, адаптивности, разнообразной структуре экзополисахариды продемонстрировали потенциал в качестве материалов для биомедицины и фармакологии, например в качестве медицинских герметиков или, как носители, в системах доставки лекарственных средств [89].

На основе экзополисахаридов разрабатываются различные формы носителей лекарственных средств, так для получения гидрогелей в форме сфер или в виде «единого» куска для доставки лекарств и создания скаффолдов альгинат сшивали различными двухвалентными катионами [92].

Также, для СДЛС исследователями был получен декстран в форме частиц [93], а на основе амфифильных свойств левана были синтезированы наночастицы [94].

Наночастицы на основе курдлана использовались для нагрузки противоопухолевым препаратом – эпирубицином. Основываясь на экспериментах *in vivo* с крысами линии Wistar, исследование показало, что созданные наночастицы способны поддерживать замедленное высвобождение эпирубицина в организме и впоследствии улучшать его противоопухолевую активность [60].

1.6 Композитные материалы на основе биополимеров и экзополисахаридов

Несмотря на множество уникальных и полезных характеристик, экзополисахариды имеют слабые стороны. Быстрая деградация, гидрофильная природа, низкая механическая прочность, низкая устойчивость к нагрузкам, особенно для изготовления биомедицинских скаффолдов, ограничивают их применение. Некоторые ЭПС сами по себе не обладают биологической активностью, что предполагает добавление лекарственных соединений для повышения биологической активности [95].

Создание композитных материалов на основе экзополисахаридов сможет решить проблемы, возникающие при работе с чистыми ЭПС, благодаря наличию вторичных полимерных молекул, которые обладают гибридными характеристиками. Более высокая механическая прочность при различных функциональных характеристиках будет способствовать образованию разнообразных функциональных групп, и отвечать за физиологические и химические свойства, которым способствуют компоненты композита. На сегодняшний день композиты ЭПС изготавливаются как с природными, так и с синтетическими полимерами [95].

Экзополисахариды сами по себе являются природными биополимерами, которые легко могут сочетаться с другими биомолекулами (белки, липиды, углеводы и др.). Созданные композиты имеют все перспективы развития в сфере здравоохранения. Основными преимуществами композитов на основе смеси ЭПС с другими природными полимерами являются биоактивность, биоразлагаемость и биосовместимость. Добавление второго полимера может

также придавать композиту определенный тип биологической активности, такой как антимикробная, противовоспалительная и даже каталитическая, что расширяет возможности применения. Поскольку оба компонента имеют натуральное происхождение, вероятность воспаления и отторжения будет снижена или даже минимальна. Вместе с этим, сами композиты не будут оказывать токсического действия на живой организм, но при этом могут выступать в качестве антимикробного препарата против патогенных микроорганизмов [96-98].

Хусейн и соавторы рассмотрели возможности смешивания различных экзополисахаридов для улучшения их механических и биологических свойств [99]. В частности, обсуждались смеси с ксантановой камедью, курдланом, гиалуроновой кислотой и декстраном, подчеркивая, как их различные комбинации можно использовать для получения универсальных материалов в зависимости от конечного применения. Например, ксантановая камедь может изменять реологические свойства различных растворов, курдлан может придавать термическую стабильность, гиалуроновая кислота может увеличивать клеточную адгезию и пролиферацию клеток, а декстран используется в качестве заменителя плазмы крови. Выбор вторичных полимеров зависит от вида дальнейшего применения композита.

Среди широкого разнообразия природных полимеров микробные полигидроксиалканоаты и экзополисахариды рассматриваются для разработки оригинальных биоматериалов из-за их уникальных физико-химических и биологических свойств. Создание композитов на их основе позволило бы улучшить эксплуатационные и технологические характеристики получаемых материалов. На данный момент опубликовано не так много работ, посвященных созданию композитов на основе ПГА и ЭПС. В работе Поли и соавторов [100] сообщалось об общем применении экзополисахаридов и полигидроксиалканоатов, синтезируемых археями. В 2016 году Мохтардзаде с соавторами [100] опубликовали монографию, посвященную, в частности,

использованию экзополисахаридов (декстрана, геллана, альгината и ксантовой камеди), полиамидов и полигидроксиалканоатов в тканевой инженерии и системах доставки лекарственных средств.

1.6.1 Композитные материалы на основе биополимеров и экзополисахаридов для создания систем доставки лекарственных средств

Модификация экзополисахаридов химическими функциональными группами и сополимеризация с другими полимерами могут привести к улучшению свойств материала и повышению функциональности систем доставки лекарств. Наличие уникальных функциональных групп делает такие носители лекарственных средств чувствительными к внешним изменениям (рН, температура и др.), тем самым модулируя контролируемое высвобождение и специфическое нацеливание молекул препарата. Что приводит к улучшению биодоступности и эффективности препарата *in vivo* при его высвобождении из носителя [36].

Комбинация ЭПС с другими полисахаридами, биополимерами или полимерами синтетического происхождения обеспечивает оптимизацию желаемых характеристик носителя, которые недоступны без сополимеризации. Комбинация приводит к получению композитов с высокими эксплуатационными характеристиками, которые можно адаптировать для новых систем доставки лекарств [34]. Микросферы на основе смеси кефирана с альгинатом были разработаны для облегчения контролируемого высвобождения антибиотика широкого спектра действия – ципрофлоксацина. На основании экспериментов *in vitro* сообщалось, что данный композит обеспечивает адекватную защиту желудка от ципрофлоксацина [101]. В другом отчете был разработан ксантановый гель, модифицированный янтарным ангидридом, для улучшения замедленного высвобождения гентамицина [102]. Анализ *in vitro* показал, что в физиологических условиях гидрогель способен поддерживать замедленное высвобождение гентамицина в течение 9 дней. Помимо сохранения эффективности антибиотика, гель, наполненный

гентамицином, показал цитосовместимость на основании анализов *in vitro* с культурой эпителиальных клеток хрусталика человека и экспериментах *in vivo* с кроликами. Ли и соавторы сообщили о разработке наночастиц карбоксиметилкурдлана, конъюгированного с холестерином, для использования в качестве носителя в СДЛС [103].

Бактериальная целлюлоза является многообещающей заменой растительного материала благодаря ее высокой прочности на разрыв, абсорбции и биосовместимости [104].

Исследование Иноуэ и соавторы [105] продемонстрировало способность бактериальной целлюлозы пролонгировать высвобождение хлоргексидина. Был создан комплекс хлоргексидина с β -циклодекстрином, который затем внедрили в целлюлозную мембрану. Сильные химические взаимодействия между комплексом хлоргексидин- β -циклодекстрин и структурой целлюлозы успешно увеличили высвобождение лекарства почти в 10 раз по сравнению с немодифицированной целлюлозой.

Таким образом, объединение экзополисахаридов с другими биополимерами в композитные материалы приводит к улучшению свойств созданных носителей и в конечном итоге к повышению функциональности систем доставки лекарственных средств.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Культивирование *Agrobacterium tumefaciens*

Для получения экзополисахаридов использовали микроорганизмы *Agrobacterium tumefaciens*. Для выращивания бактерий *Agrobacterium tumefaciens* за основу приняты: буферный раствор следующего состава: K_2HPO_4 – 1 (г/л) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 (г/л), а также дрожжевой экстракт – 1 (г/л) – стандартная среда (модификации данной среды указаны ниже). Источники углерода варьировались, использовали фруктозу – 15 г/л (15 г/л на нулевой час и 15 г/л на 48 час) и сложный сахаросодержащий субстрат – свекловичную мелассу (г/л): 20; 30; 40; 50, в зависимости от эксперимента. В приготовленную среду добавляли 20 мл инокулированной музейной культуры (получение инокулята указано в пункте 2.2).

Культивирование проводилось 72 часа, в стеклянных колбах объемом 500 мл при коэффициенте заполнения 0,4 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30°C и 200 об/мин.

Варьирование состава культуральной среды, ход эксперимента:

Для разработки культуральной среды, способствующей увеличению выхода экзополисахаридов, варьировали следующие значения: микроэлементы – отсутствие/наличие, концентрация $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, источник углерода – фруктоза/меласса.

Контроль: среда, состоящая из K_2HPO_4 – 1 (г/л) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 (г/л), дрожжевой экстракт – 1 (г/л), источник углерода – фруктоза – 15 г/л.

Модификации: 1. Среда (указанная выше, как контроль) была модифицирована добавлением микроэлементов. Микроэлементы вводили из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08 г/л;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050 г/л;
 NiCl_2 – 0,008 г/л.

2. Среда (указанная выше, как контроль) была модифицирована добавлением микроэлементов и увеличением $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вдвое:

K_2HPO_4 – 1 (г/л) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 (г/л), дрожжевой экстракт – 1 (г/л), источник углерода – фруктоза – 15 г/л + микроэлементы.

3. В третьей модификации фруктоза, как источник углерода, заменялась на сахаросодержащий субстрат – свекловичную мелассу в разных концентрациях (г/л): 20; 30; 40; 50.

Состав среды: K_2HPO_4 – 1 (г/л) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 (г/л), дрожжевой экстракт – 1 (г/л), источники углерода – меласса ((г/л): 20; 30; 40; 50).

Каждый эксперимент проводился в трех повторностях, в трех стеклянных колбах объемом 500 мл, экзополисахариды, полученные из трех колб (подробнее о получении в пункте 2.3) объединяли в единый результат, высушивая в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) 24 часа при 24°C. Из трех повторностей находили среднее значение, сравнивали результаты.

2.2 Подготовка инокулята

В коническую колбу объемом 500 мл добавляли 200 мл буферного раствора следующего состава: K_2HPO_4 – 1 (г/л) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 (г/л), а также дрожжевой экстракт – 1 (г/л), после чего стерилизовали. В стерильных условиях в колбу переносили музейную культуру *Agrobacterium tumefaciens*, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике, и фруктозу в концентрации 15 г/л. Колбу устанавливали в термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 на 24 часа, при 30°C и 200 об/мин.

2.3 Получение экзополисахаридов

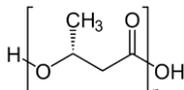
Экстрагирование экзополисахаридов проводили методом спиртового осаждения, используемым для выделения полисахаридов при помощи этанола. 72-х часовую бактериальную культуру, заливали «ледяным спиртом (этанолом)» в соотношении 1:3 (культура:спирт), оставляли в холодильнике при 4°C в течение суток. По истечении времени осаждённые экзополисахариды извлекали из спирта и промачивали бумажным полотенцем для удаления лишней жидкости и образования плотной массы. Далее ЭПС перемещали в сушильный шкаф Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) и выдерживали при 24°C 24 часа, либо подвергали лиофилизации. После чего ЭПС взвешивали.

2.4 Изготовление микрочастиц и композитных микрочастиц на основе экзополисахаридов и полигидроксиалканоатов

Метод изготовления микрочастиц и композитных микрочастиц перенят из публикации Пэн Чжая и соавторов [106], где авторы получали микросферы из сополимера полимолочной и полигликолевой кислот – ПЛГА, а также композитные микросферы из ПЛГА и альгината, которые нагружали бычьим сывороточным альбумином. Материалы и методы модифицированы под использование других, взятых нами полимеров, концентрации материалов подобраны экспериментальным способом.

Для получения микрочастиц использовали поли(3-гидроксибутират) – П(ЗГБ) из семейства полигидроксиалканоатов, предоставленный институтом биофизики СО РАН. Полимер синтезирован бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, на фруктозе, в качестве источника углерода, характеристика полимера представлена в таблице 1. Образцы ЭПС получены способом, описанным в пунктах 2.1-2.3 и далее лиофильно высушены.

Таблица 1 – Характеристика поли(3-гидроксибутирата)

Название/формула	М _в , кДа	М _ч , кДа	Пд	Т _{пл} , °С	Т _{дегр} , °С
Поли(3-гидроксибутират) П(ЗГБ) 	450	160	2,8	175	290

Микрочастицы получали из поли(3-гидроксибутирата) методом испарения растворителя из двухкомпонентных (вода–масло) эмульсий. Двухкомпонентная эмульсия содержала 10 мл 2% раствора П(ЗГБ) в хлороформе и 100 мл 0,5% водного раствора поливинилового спирта (ПВС).

П(ЗГБ) растворяли в хлороформе, после этого постепенно переносили в раствор ПВС, одновременно перемешивая с помощью гомогенизатора “Heidolph SilentCrusher M” (Германия) при 7000 об/мин в течение 5 минут.

Композитные микрочастицы получали методом испарения растворителя из трехкомпонентных (вода–масло–вода) эмульсий. Трехкомпонентная эмульсия содержала 1 мл 0,7% водного раствора ЭПС, 10 мл 2% раствора П(ЗГБ) в хлороформе, 100 мл 0,5% водного раствора ПВС. Для стабилизации эмульсии П(ЗГБ)/ЭПС использовали 0,5 мл эмульгатора Твин-80 (полиоксиэтилен – 20-сорбит моноолеат).

П(ЗГБ) растворяли в хлороформе, затем к нему добавляли Твин-80 и перемешивали на гомогенизаторе “IKA Ultra-Turrax T10 basic” (Германия), при выставленной единице на приборе (8000 об/мин), постепенно вводя растворенные в дистиллированной воде ЭПС и доводя до однородности. Полученную смесь постепенно переносили в раствор ПВС, одновременно перемешивая с помощью гомогенизатора “Heidolph SilentCrusher M” (Германия) при 7000 об/мин в течение 5 минут.

Полученные эмульсии оставляли на 24 часа на магнитной мешалке “Heidolph MR Hei-Standard” при постоянном механическом перемешивании 500 об/мин, до полного испарения растворителя. Сформированные микрочастицы

собирали центрифугированием, при 10000 об/мин 10 мин (для удаления ПВС), затем переносили материал в эппендорфы на 2 мл и промывали 5 раз (также центрифугированием) дистиллированной водой при 14000 об/мин 5 мин. Далее лиофильно высушивали. Готовые образцы хранили в холодильнике.

Выход сухого вещества (конечная масса микрочастиц) рассчитывали как разницу между массой готовых микрочастиц и массой полимера, использованного для их изготовления.

2.5 Изготовление композитных микрочастиц нагруженных лекарственным препаратом

Для разработки системы микрочастиц с лекарственным препаратом было выбрано противомикробное средство под торговым названием – Тиенам, содержащее 500 мг действующего вещества имипенема. Выбор лекарственного препарата обусловлен востребованностью в клинической практике при лечении длительно текущих заболеваний, стабильностью в растворах и возможностью взаимодействия с неполярными растворителями без изменения свойств используемого лекарственного средства [107]. Далее в работе будет упоминаться только действующее вещество.

Для получения микрочастиц, нагруженных антибиотиком, использовали метод, описанный в пункте 2.4. Микрочастицы получали из поли(3-гидроксибутирата) методом испарения растворителя из трехкомпонентных (вода–масло–вода) эмульсий. Эмульсия состояла из 10 мл 2% раствора П(ЗГБ) в хлороформе, 100 мл 0,5% водного раствора ПВС, 7,1 мг имипенема растворенного в 1 мл дистиллированной воды, 0,5 мл эмульгатора Твин-80 (полиоксиэтилен – 20-сорбит моноолеат).

После растворения П(ЗГБ) в хлороформе, к нему добавляли Твин-80 и ставили перемешиваться на гомогенизаторе “IKA Ultra-Turrax T10 basic” (Германия), при выставленной единице на приборе (8000 об/мин), постепенно вводя растворенный в дистиллированной воде антибиотик и доводя до однородности. Полученную смесь постепенно переносили в раствор ПВС,

одновременно перемешивая с помощью гомогенизатора “Heidolph SilentCrusher M” (Германия) при 7000 об/мин в течение 5 минут.

Композитные микрочастицы, нагруженные антибиотиком, получали также методом испарения растворителя из трехкомпонентных (вода–масло–вода) эмульсий. Эмульсия состояла из 1 мл 0,7% водного раствора ЭПС, 10 мл 2% раствора П(ЗГБ) в хлороформе, 100 мл 0,5% водного раствора ПВС, 7,1 мг имипенема растворенного в 1 мл дистиллированной воды, 0,5 мл эмульгатора Твин-80.

Приготовленные по отдельности водные растворы ЭПС и имипенема смешивали вместе. П(ЗГБ) растворяли в хлороформе, затем к нему добавляли Твин-80 и перемешивали на гомогенизаторе “IKA Ultra-TurraX T10 basic” (Германия), при выставленной единице на приборе (8000 об/мин), плавно вводя смесь из ЭПС и имипенема, доводя до однородности. Двухкомпонентную эмульсию постепенно переносили в раствор ПВС, одновременно перемешивая с помощью гомогенизатора “Heidolph SilentCrusher M” (Германия) при 7000 об/мин в течение 5 минут.

Получившиеся эмульсии оставляли на 24 часа на магнитной мешалке “Heidolph MR Hei-Standard” при постоянном механическом перемешивании 500 об/мин, до полного испарения растворителя. Сформированные микрочастицы собирали центрифугированием, при 10000 об/мин 15 мин, затем переносили материал в эппендорфы на 2 мл и промывали 5 раз (также центрифугированием) дистиллированной водой при 14000 об/мин 5 мин. Далее лиофильно высушивали.

При сборе микрочастиц, оставшийся супернатант отбирали для определения в нем остаточной концентрации препарата и дальнейшего расчета эффективности инкапсулирования препарата в микрочастицы.

2.6 Характеристика микрочастиц

Размер частиц, их полидисперсность и дзета-потенциал изучали с помощью системы для характеристики наночастиц “Malvern Zetasizer Nano ZS”. Предварительно образцы микрочастиц в 5 мг были диспергированы в 1 мл дистиллированной воды, при помощи ультразвукового гомогенизатора “Sonicator 3000” (США).

Морфологию поверхности микрочастиц изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) S-5500 (Hitachi, Tokyo, Japan). Для этого методом напыления микрочастицы покрывали платиной с использованием электрического потенциала 2,0 кВ при токе 25 мА в течение 6 минут с помощью устройства для напыления K550X (Emitech, Quorum Technologies Ltd., UK).

Выход готовых микрочастиц и композитов (a) рассчитывали в процентах, от массы использованных для их изготовления полимеров, по формуле (1):

$$a = \frac{m_M}{m_P} \times 100\%, \quad (1)$$

где m_M – масса полученных микрочастиц, мг; m_P – масса использованного полимера, мг.

Процент включения имипенема в микрочастицах определяли спектрофотометрически (по максимумам поглощения 299 нм) при сравнении с контрольным раствором имипенема в 0,5% ПВС.

2.7 Высвобождение лекарственного препарата *in vitro*

Для изучения динамики высвобождения лекарственного препарата, стерильные микрочастицы из П(ЗГБ) массой 30 мг и композиты с ЭПС массой 13 мг помещали в центрифужные пробирки с винтовой крышкой, содержащие 5 мл стерильного сбалансированного фосфатного буфера (pH = 7.4) и убирали в термостат при 37°C. Состав фосфатного буфера: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,0 г/л, KH_2PO_4 – 1,5 г/л. Предварительно микрочастицы стерилизовали УФ излучением в течение 20 минут.

Для определения количества имипенема, вышедшего в среду, анализировали пробы, предварительно осадив микрочастицы центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин) на спектрофотометре Genesys 10S UV (Thermo scientific, USA) при излучении на длине волны 299 нм. В случае композитных микрочастиц П(ЗГБ)/ЭПС в качестве фонового раствора использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 1,3мг ЭПС. Количество вносимого ЭПС соответствовало фактическому содержанию ЭПС в микрочастицах.

Анализ проводили в течение 28 суток, пробы отбирали на 1, 2, 3, 6, 9, 13, 16, 24, 28 сутки.

2.8 Антимикробная активность

Антимикробную активность микрочастиц П(ЗГБ) и композитов с ЭПС, содержащих имипенем, а также лиофильно высушенных ЭПС, оценивали методом диффузии в агар на грамположительных бактериях *Micrococcus luteus* и грамотрицательных бактериях *Cupriavidus necator* В-10646.

Для инокуляции поверхности агаровой чашки использовали стерильный ватный тампон, пропитанный штаммами *Micrococcus luteus* и *Cupriavidus necator* В-10646, соответствующий 1 стандартному раствору МакФарланда. Культуры высевали на мясопептонный агар, спустя 10 минут, в котором вырезали лунки диаметром 1 см. В них помещали 300 мкл физраствора содержащего 33 мг композитов с ЭПС (содержащих 0,37 мг имипенема) и 33 мг микрочастиц из П(ЗГБ) (содержащих 0,16 мг имипенема), либо 10 мг лиофильно высушенных ЭПС. В качестве контроля использовали диск чувствительности имипенема (с содержанием препарата 0,01 мг, BioRad, Франция). Образцы инкубировали 24 часа, затем измеряли диаметр зон задержки роста.

Результаты описывали по таблице «интерпретация значений зон подавления роста при определении чувствительности к противомикробным препаратам микроорганизмов с обычными питательными потребностями»,

прописанной в инструкции по применению Набора дисков для определения чувствительности к противомикробным препаратам – 1 (НД-ПМП-1).

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку средней арифметической. Все эксперименты имели три повторности.

Глава 3. Результаты

Страницы 34-46 изъяты в связи с авторским правом.

ВЫВОДЫ

1. Добавление микроэлементов в питательную среду способствовало увеличению выхода экзополисахаридов в два раза, по сравнению с использованием стандартной среды.
2. Установлено, что *Agrobacterium tumefaciens* способны расти на мелассе в качестве источника углерода, максимальный выход экзополисахаридов отмечен при концентрации 40 г/л – 3,8 г/л.
3. С помощью эмульсионного метода созданы микрочастицы из П(ЗГБ) и композитные микрочастицы с ЭПС. Микрочастицы обладали сферической формой, были гетерогенными по размеру, встречались агломераты. Установлено, что добавление экзополисахаридов приводит к увеличению размеров микрочастиц и уменьшению поверхностного заряда.
4. Получены микрочастицы из П(ЗГБ) и композитные микрочастицы с ЭПС, нагруженные антибактериальным препаратом – имипенемом. Показано, что добавление экзополисахаридов увеличивает эффективность включения имипенема практически в три раза.
5. В модельной среде продемонстрировано пролонгированное высвобождение имипенема из микрочастиц в течение 28 суток. Отмечено, что добавление экзополисахаридов повышает отток препарата в среду.
6. На примере модельных микроорганизмов показано, что микрочастицы, нагруженные имипенемом, обладают антимикробной активностью, а зоны лизиса сопоставимы с результатами коммерческого диска.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- M_v – средневесовая молекулярная масса полимера
- M_n – среднечисловая молекулярная масса полимера
- НДФ-сахара – нуклеозиддифосфат сахара
- ПВС – поливиниловый спирт
- П(ЗГБ) – поли-3-гидроксибутират
- ПГА – полигидроксиалканоаты
- Пд – полидисперсность
- ПЛГА – сополимер полимолочной и полигликолевой кислот
- ПС – полисахариды
- ПСМ – полисахариды микроорганизмов
- СДЛС – система доставки лекарственных средств
- $T_{\text{дегр}}$ – температура термической деградации (полимера)
- $T_{\text{пл}}$ – температура плавления (полимера)
- ЭПС – экзополисахариды

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Тасекеев М. С., Еремеева Л. М. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК: Аналит.обзор. - Алматы: НЦ НТИ, 2009. - 200 с.
2. Park, D.H. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil/ D.H. Park, B.S. Kim //N. Biotechnol. - 2011. - p.719–724.
3. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J.Możejko-Ciesielska, R.Kiewisz //Microbiological research. - 2016. - Т. 192. - С. 271-282.
4. Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D. The prokaryotes. Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer, 2006. P. 766–776.
5. Sandford, P.A., Cottrell, I.W., & Pettitt, D.J. (1984). Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. Pure and Applied Chemistry, 56, 879 - 892.
6. Наумов Г.Н., Дмитриев В.И., Пенкин А.Г. // Практические аспекты медицинской биотехнологии. Материалы 2-го съезда Общества биотехнологов России. Москва: Макс Пресс, 2004. С. 93-94.
7. Madhuri, K. V., Prabhakar, K.V. (2014). Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. Oriental journal of chemistry, 30, 1401-1410.
8. Brummer Y., Cui S.W. Food Polysaccharides and their Applications // Eds. Stephen A.M., Phillips G.O., Williams P.A. BR: CRC Press, 2006. 37 p.
9. Вудсайт Е.Е., Квапинский Е. Молекулярная биология. М.: Мир, 1977. С. 145-200.
10. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р. Микробный синтез экзополисахаридов на C1-C2 – соединениях. Киев: Наукова думка, 1992. 211 с.

11. V. Djoković, R. Krsmanović, D.K. Božanić, M. McPherson, G. Van Tendeloo, P.S. Nair, M.K. Georges, T. Radhakrishnan, Adsorption of sulfur onto a surface of silver nanoparticles stabilized with sago starch biopolymer, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 73 (2009) 30-35.
12. Liu, L.; Li, M.; Yu, M.; Shen, M.; Wang, Q.; Yu, Y.; Xie, J. Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 121, 743–751.
13. Chakraborty, I.; Sen, I.K.; Mondal, S.; Rout, D.; Bhanja, S.K.; Maity, G.N.; Maity, P. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, 22, 101425.
14. Noufal, Z.M.; Sivaperumal, P.; Elumalai, P.J. Extraction, characterization, and anticancer potential of extracellular polymeric substances from marine actinobacteria of *Streptomyces* species. *Adv. Pharm. Technol. Res.* 2022, 13 (Suppl. 1), S125-S129.
15. Vinothkanna, A.; Sathiyarayanan, G.; Rai, A.K.; Mathivanan, K.; Saravanan, K.; Sudharsan, K.; Kalimuthu, P.; Ma, Y.; Sekar, S. Exopolysaccharide Produced by Probiotic *Bacillus albus* DM-15 Isolated from Ayurvedic Fermented Dasamoolarishta: Characterization, Antioxidant, and Anticancer Activities. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 832109.
16. Andrew, M.; Jayaraman, G. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydr. Res.* 2020, 487, 107881.
17. Khan, R.; Shah, M.D.; Shah, L.; Lee, P.C.; Khan, I. Bacterial polysaccharides- A big source for prebiotics and therapeutics. *Front. Nutr.* 2022, 9, 1031935.
18. Chaisuwan, W.; Jantanasakulwong, K.; Wangtueai, S.; Phimolsiripol, Y.; Chaiyaso, T.; Techapun, C.; Phongthai, S.; You, S.; Regenstein, J.M.; Seesuriyachan, P. Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications and bioactivities. *Food Biosci.* 2020, 35, 100564.

19. A. Pérez-Ramos, M. Nácher-Vázquez, S. Notararigo, P. López, M.L. Mohedano, *Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides*, Elsevier Inc, 2015.
20. P.H.P. Prasanna, A. Bell, A.S. Grandison, D. Charalampopoulos, Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 533-540.
21. Y. Abid, A. Casillo, H. Gharsallah, I. Joulak, R. Lanzetta, M. Michela, H. Attia, S. Azabou, International journal of biological macromolecules production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 719-728.
22. B. Bhat, B.K. Bajaj, Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei, *Bioresour. Technol.* 254 (2018) 264-267.
23. M.S. Riaz Rajoka, M. Jin, Z. Haobin, Q. Li, D. Shao, C. Jiang, Q. Huang, H. Yang, J. Shi, N. Hussain, Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT - Food Sci. Technol.* 89 (2018) 638-647.
24. Q. Zhou, F. Feng, Y. Yang, F. Zhao, R. Du, Z. Zhou, Y. Han, Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine, *Int. J. Biol. Macromol.* (2017) 1-8.
25. J. Yother, *Capsules of Streptococcus pneumoniae and Other Bacteria : Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation*, (n.d.).
26. J. Li, N. Wang, The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *BMC Microbiol.* 12 (2012).
27. De Vuyst, L.; De Vin, F.; Vaningelgem, F.; Degeest, B. Recent Developments in the Biosynthesis and Applications of Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 687-707.

28. P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde, A. Margolles, C.G. De Los Reyes-Gavilán, S. Salminen, Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus, *J. Food Prot.* 69 (2006) 2011-2015.
29. S. Li, R. Huang, N.P. Shah, X. Tao, Y. Xiong, H. Wei, Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315, *J. Dairy Sci.* (2014) 1–10.
30. Васильев Н. В., Луцюк Н. Б., Палий Г. К., Смирнова О. В. Биохимия и иммунология микробных полисахаридов. - Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1984. - 303 с.
31. Sørensen, H.M.; Rochfort, K.D.; Maye, S.; MacLeod, G.; Brabazon, D.; Loscher, C.; Freeland, B. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients* 2022, 14, 2938.
32. De Vuyst, L.; Degeest, B. Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999, 23, 153-177.
33. Angelin J, Kavitha M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol.* 2020 Nov 1;162:853-865.
34. Adegbolagun TI, Odeniyi OA, Odeniyi MA. Drug delivery applications and future prospects of microbial exopolysaccharides. *Polim Med.* 2023;53(2):117-127.
35. Osemwegie, O.O.; Adetunji, C.O.; Ayeni, E.A.; Adejobi, O.I.; Arise, R.O.; Nwonuma, C.O.; Oghenekaro, A.O. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: Current status and perspectives in Africa. *Heliyon* 2020, 6.
36. Ishika S., Sriparna D. Bacterial exopolysaccharides in drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2022, 74, 103557.
37. Sutherland, I.W. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 1972, 8, 143-213.

38. Mahmoud, Y.A.-G.; El-Naggar, M.E.; Abdel-Megeed, A.; El-Newehy, M. Recent Advancements in Microbial Polysaccharides: Synthesis and Applications. *Polymers* 2021, 13, 4136.
39. Xiao, M.; Ren, X.; Yu, Y.; Gao, W.; Zhu, C.; Sun, H.; Kong, Q.; Fu, X.; Mou, H. Fucose-containing bacterial exopolysaccharides: Sources, biological activities, and food applications. *Food Chem. X* 2022, 13, 100233.
40. Casillo, A.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Corsaro, M.M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: Structures, properties, ecological roles and applications. *Mar. Drugs* 2018, 16, 69.
41. Wang, J.; Salem, D.R.; Sani, R.K. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydr. Polym.* 2019, 5, 8–26.
42. Knowles, E.J.; Castenholz, R.W. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008, 66, 261–270.
43. Isfahani, F.M.; Tahmourespour, A.; Hoodaji, M.; Ataabadi, M.; Mohammadi, A. Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. *J. Clean. Prod.* 2018, 185, 922–928.
44. Pallach, M.; Marchetti, R.; Di Lorenzo, F.; Fabozzi, A.; Giraud, E.; Gully, D.; Paduano, L.; Molinaro, A.; D’Errico, G.; Silipo, A. *Zymomonas mobilis* exopolysaccharide structure and role in high ethanol tolerance. *Carbohydr. Polym.* 2018, 201, 293–299.
45. Kuschmierz, L.; Meyer, M.; Bräsen, C.; Wingender, J.; Schmitz, O.J.; Siebers, B. Exopolysaccharide composition and size in *Sulfolobus acidocaldarius* biofilms. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 982745.
46. Secor, P.R.; Michaels, L.A.; Bublitz, D.C.; Jennings, L.K.; Singh, P.K. The Depletion Mechanism Actuates Bacterial Aggregation by Exopolysaccharides and Determines Species Distribution & Composition in Bacterial Aggregates. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2022, 12, 869736.

47. Balducci, E.; Papi, F.; Capialdi, D.E.; Del Bino, L. Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 4030.
48. Timilsina, S.; Potnis, N.; Newberry, E.A.; Liyanapathirana, P.; Iruegas-Bocardo, F.; White, F.F.; Goss, E.M.; Jones, J.B. Xanthomonas diversity, virulence, and plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020, 18, 415–427.
49. Tang, J.L.; Tang, D.J.; Dubrow, Z.E.; Bogdanove, A.; An, S.Q. Xanthomonas campestris Pathovars. *Trends Microbiol.* 2021, 29, 182–183.
50. F. Freitas, V.D. Alves, M.A.M. Reis, Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 388–398.
51. Ryan, P.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Caplice, N.M.; Stanton, C. Sugar-Coated: Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria for Food and Human Health Applications. *Food Funct.* 2015, 6, 679–693.
52. Khalid, M.Y.; Arif, Z.U. Novel biopolymer-based sustainable composites for food packaging applications: A narrative review. *Food Packag. Shelf Life* 2022, 33, 100892.
53. T. Sungur, B. Aslim, C. Karaaslan, B. Aktas, Anaerobe impact of exopolysaccharides (EPSs) of Lactobacillus gasseri strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa), *Anaerobe* 47 (2017) 137–144,
54. A.T. Adesulu-dahunsi, K. Jeyaram, Production of Exopolysaccharide by Strains of Lactobacillus plantarum YO175 and OF101 Isolated From Traditional Fermented Cereal Beverage, 2018.
55. M.F.P. Domingos-lobos, A. Nagy, C. Stanton, P.R. Ross, E. Gelencsér, C.C.G. Silva, Immunomodulatory activity of exopolysaccharide producing Leuconostoc citreum strain isolated from Pico cheese, *J. Funct. Foods* 33 (2017) 235–243.

56. S. Górska, W. Jachymek, J. Rybka, M. Strus, P.B. Heczko, A. Gamian, Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 108–114.
57. K.V. Madhuri, K. Vidya Prabhakar, Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications, *Orient. J. Chem.* 30 (2014) 1401–1410.
58. M. Laura, S. Notararigo, M. Ncher, P.F. de Palencia, R. Aznar, P. Lpez, Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Food Addit* (2012).
59. B. Péant, G. LaPointe, C. Gilbert, D. Atlan, P. Ward, D. Roy, Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*, *Microbiology* 151 (2005) 1839–1851.
60. Mohd Nadzir, M.; Nurhayati, R.W.; Idris, F.N.; Nguyen, M.H. Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides: A Review. *Polymers* 2021, 13, 530.
61. Хусаинов И.А. Современные представления о биосинтезе бактериальных экзополисахаридов // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №5.
62. Morgan JL, Strumillo J, Zimmer J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*. 2013 Jan 10;493(7431):181-6.
63. Netrusov, A.I.; Liyaskina, E.V.; Kurgaeva, I.V.; Liyaskina, A.U.; Yang, G.; Revin, V.V. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms* 2023, 11, 1541.
64. Khalil, M.A.; Sonbol, F.I.; Al-Madboly, L.A.; Aboshady, T.A.; Alqurashi, A.S.; Ali, S.S. Exploring the Therapeutic Potentials of Exopolysaccharides Derived from Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Antioxidant, Antitumor, and Periodontal Regeneration. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 803688.
65. Werning, M.L.; Hernández-Alcántara, A.M.; Ruiz, M.J.; Soto, L.P.; Dueñas, M.T.; López, P.; Frizzo, L.S. Biological Functions of Exopolysaccharides from

Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals. *Foods* 2022, 11, 1284.

66. Ха Т. З., Канарский А. В., Канарская З. А., Щербаков А. В., Щербакова Е. Н. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus Mucilaginosus* на питательной среде с мелассой // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. №4 (35).
67. Choi, I.S.; Ko, S.H.; Lee, M.E.; Kim, H.M.; Yang, J.E.; Jeong, S.-G.; Lee, K.H.; Chang, J.Y.; Kim, J.-C.; Park, H.W. Production, Characterization, and Antioxidant Activities of an Exopolysaccharide Extracted from Spent Media Wastewater after *Leuconostocmesenteroides* WiKim32 Fermentation. *ACS Omega* 2021, 6, 8171-8178.
68. Bhatia, S.K.; Gurav, R.; Kim, B.; Kim, S.; Cho, D.-H.; Jung, H.; Kim, Y.-G.; Kim, J.-S.; Yang, Y.-H. Coproduction of exopolysaccharide and polyhydroxyalkanoates from *Sphingobiummyanoikuyae* BBL01 using biochar pretreated plant biomass hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 2022, 361, 127753.
69. Torino, M.I.; Taranto, M.P.; Sesma, F.; De Valdez, G.F. Heterofermentative Pattern and Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in Response to Environmental PH. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 846-852.
70. Gamar-Nourani, L.; Blondeau, K.; Simonet, J.M. Influence of Culture Conditions on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strain C83. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 85, 664-672.
71. Zisu, B.; Shah, N.P. Effects of PH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 3405-3415.
72. Cheirsilp, B.; Shimizu, H.; Shioya, S. Modelling and Optimization of Environmental Conditions for Kefiran Production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57, 639-646.

73. Imran, M.Y.M.; Reehana, N.; Jayaraj, K.A.; Ahamed, A.A.P.; Dhanasekaran, D.; Thajuddin, N.; Alharbi, N.S.; Muralitharan, G. Statistical Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 93, 731-745.
74. Gamar, L.; Blondeau, K.; Simonet, J.M. Physiological Approach to Extracellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strain C83. *J. Appl. Microbiol.* 1997, 83, 281-287.
75. Cerning, J.; Bouillanne, C.; Landon, M.; Desmazeaud, M. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from SlimeForming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 1992, 75, 692-699.
76. Tallon, R.; Bressollier, P.; Urdaci, M.C. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* 2003, 154, 705-712.
77. De Vuyst, L.; Vanderveken, F.; Van De Ven, S.; Degeest, B. Production by and Isolation of Exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* Grown in a Milk Medium and Evidence for Their Growth-Associated Biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84, 1059-1068.
78. Degeest, B.; Mozzi, F.; De Vuyst, L. Effect of Medium Composition and Temperature and PH Changes on Exopolysaccharide Yields and Stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 Fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 79, 161-174.
79. Macedo, M.G.; Lacroix, C.; Gardner, N.J.; Champagne, C.P. Effect of Medium Supplementation on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in Whey Permeate. *Int. Dairy J.* 2002, 12, 419-426.
80. Vaningelgem, F.; Zamfir, M.; Adriany, T.; De Vuyst, L. Fermentation Conditions Affecting the Bacterial Growth and Exopolysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in Milk-Based Medium. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 1257-1273.

81. Ismail, B.; Nampoothiri, K.M. Production, Purification and Structural Characterization of an Exopolysaccharide Produced by a Probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch. Microbiol.* 2010, 192, 1049-1057.
82. Shene, C.; Canquil, N.; Bravo, S.; Rubilar, M. Production of the Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of Growth Conditions on Fermentation Kinetics and Intrinsic Viscosity. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 124, 279-284.
83. Leroy, F.; Degeest, B.; De Vuyst, L. A Novel Area of Predictive Modelling: Describing the Functionality of Beneficial Microorganisms in Foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 73, 251-259.
84. Grobgen, G.J.; Chin-Joe, I.; Kitzen, V.A.; Boels, I.C.; Boer, F.; Sikkema, J.; Smith, M.R.; De Bont, J.A.M. Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 1333-1337.
85. Mozzi, F.; Savoy De Giori, G.; Oliver, G.; Font De Valdez, G. Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus-Casei*.1. Influence of Salts. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 1995, 50, 186-188.
86. Grobgen, G.J.; Boels, I.C.; Sikkema, J.; Smith, M.R.; De Bont, J.A.M. Influence of Ions on Growth and Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* NCFB 2772. *J. Dairy Res.* 2000, 67, 131-135.
87. Zajšek, K.; Goršek, A.; Kolar, M. Cultivating Conditions Effects on Kefiran Production by the Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria Imbedded within Kefir Grains. *Food Chem.* 2013, 139, 970-977.
88. Ding, C.; Li, Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Mat. Sci. Eng. C* 2017, 76, 1440-1453.
89. Taberero A, Cardea S. Microbial Exopolysaccharides as Drug Carriers. *Polymers (Basel)*. 2020 Sep 19;12(9):2142.

90. Danaei, M.; Dehghankhold, S.; Ataei, S.; Davarani, F.H.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* 2018, 10, 57.
91. Martín del Valle, E.; Galán, M.A.; Carbonell, R. Drug delivery technologies: The way forward in the new decade. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009, 48, 2475-2486.
92. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 37, 106-126.
93. Sarwat, F.; Qader, S.A.U.; Aman, A.; Ahmed, N. Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroids* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.* 2008, 4, 379-386.
94. González-Garcinuño, A.; Tabernero, A.; Sánchez-Álvarez, J.M.; Galán, M.A.; Martín del Valle, E.M. Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight. *Microb. Cell Fact.* 2017, 16, 91-102.
95. Ahuja, V.; Bhatt, A.K.; Banu, J.R.; Kumar, V.; Kumar, G.; Yang, Y.-H.; Bhatia, S.K. Microbial Exopolysaccharide Composites in Biomedicine and Healthcare: Trends and Advances. *Polymers* 2023, 15, 1801.
96. He, W.; Wang, X.; Hang, T.; Chen, J.; Wang, Z.; Mosselhy, D.A.; Xu, J.; Wang, S.; Zheng, Y. Fabrication of Cu²⁺-loaded phasetransited lysozyme nanofilm on bacterial cellulose: Antibacterial, anti-inflammatory, and pro-angiogenesis for bacteria-infected wound healing. *Carbohydr. Polym.* 2023, 309, 120681.
97. Biswas, A.; Ahmed, T.; Rana, M.R.; Hoque, M.M.; Ahmed, M.F.; Sharma, M.; Sridhar, K.; Ara, R.; Stephen Inbaraj, B. Fabrication and Characterization of ZnO Nanoparticles-Based Biocomposite Films Prepared Using Carboxymethyl Cellulose, Taro Mucilage, and Black Cumin Seed Oil for Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Agronomy* 2023, 13, 147.
98. Ul-Islam, M.; Alhajaim, W.; Fatima, A.; Yasir, S.; Kamal, T.; Abbas, Y.; Khan, S.; Khan, A.H.; Manan, S.; Ullah, M.W.; et al. Development of low-cost

- bacterial cellulose-pomegranate peel extract-based antibacterial composite for potential biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023, 231, 123269.
99. Hussain, A.; Zia, K.M.; Tabasum, S.; Noreen, A.; Ali, M.; Iqbal, R.; Zuber, M. Blends on composite exopolysaccharides; properties and applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 94, 10-27.
 100. Carvalho, L.T.; Vieira, T.A.; Zhao, Y.; Celli, A.; Medeiros, S.F.; Lacerda, T.M. Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 183, 1514-1539.
 101. Blandón, L.M.; Nosedá, M.D.; Islan, G.A.; Castro, G.R.; de Melo Pereira, G.V.; Thomaz-Soccol, V.; Soccol, C.R. Optimisation of culture conditions for kefiran production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* 2018, 16, 14-21.
 102. Wang, B.; Han, Y.; Lin, Q.; Liu, H.; Shen, C.; Nan, K.; Chen, H. In vitro and in vivo evaluation of xanthan gum–succinic anhydride hydrogels for the ionic strength-sensitive release of antibacterial agents. *J. Mater. Chem. B* 2016, 4, 1853-1861.
 103. Li, L.; Gao, F.-P.; Tang, H.-B.; Bai, Y.-G.; Li, R.-F.; Li, X.-M.; Liu, L.-R.; Wang, Y.-S.; Zhang, Q.-Q. Self-assembled nanoparticles of cholesterol-conjugated carboxymethyl curdlan as a novel carrier of epirubicin. *Nanotechnology* 2010, 21, 265601.
 104. Yoshino, A.; Tabuchi, M.; Uo, M.; Tatsumi, H.; Hideshima, K.; Kondo, S.; Sekine, J. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. *Acta Biomater.* 2013, 9, 6116-6122.
 105. Inoue, B.S.; Streit, S.; Schneider, A.L.D.S.; Meier, M.M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 148, 1098-1108.

106. Zhai, P.; Chen, X.B.; Schreyer, D.J. PLGA/alginate composite microspheres for hydrophilic protein delivery. *Materials Science & Engineering C*. 2015, 56, 251-259.
107. А. В. Горева, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова, Э. Д. Сински / Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров окисалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 224.

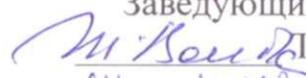
Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Г. Г. Волова
«24» июня 2024 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Микробиологический синтез экзополисахаридов и их использование в составе
композитных материалов для разработки систем доставки лекарственных
средств

Руководитель


_____ подпись

доцент, к.б.н., Н.О. Жила

Магистрант


_____ подпись

Я.В. Филиппова

Рецензент


_____ подпись

н.с., к.б.н., А.В. Муруева

Красноярск 2024