

УДК 577.114

Получение и свойства гель-пленки бактериальной целлюлозы

Р. Ю. МИТРОФАНОВ, В. В. БУДАЕВА, Г. В. САКОВИЧ

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН,
ул. Социалистическая, 1, Бийск 659322 (Россия)**E-mail: ipcet@mail.ru, budaeva@ipcet.ru*

(Поступила 26.10.09; после доработки 22.12.09)

Аннотация

Приведены результаты исследований физико-химических свойств пленки бактериальной целлюлозы, полученной при культивировании симбиоза уксуснокислых бактерий *Acetobacter xylinum* и дрожжей рода *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*. Приведена блок-схема получения и очистки целлюлозы от примесей. Показаны высокие потребительские свойства бактериальной целлюлозы. Определены сорбционные свойства по отношению к ϵ -аминокапроновой кислоте и маслу облепиховому. Оценена перспективность использования гель-пленки бактериальной целлюлозы для создания трансдермальных терапевтических систем.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, гель-пленка, трансдермальные терапевтические системы, облепиховое масло, ϵ -аминокапроновая кислота, *Medusomyces gisevii* J. Lindau

ВВЕДЕНИЕ

В начале 60-х годов прошлого столетия успехи биотехнологии обеспечили широкое применение микробных полисахаридов, часто называемых “биополимерами”. В настоящее время микробные полисахариды находят широкое применение в самых различных сферах человеческой деятельности: в медицине, фармацевтической, пищевой, химической промышленности, в сельском хозяйстве и даже в таких “тяжелых” отраслях, как гидрометаллургия, добыча нефти, обогащение руд цветных и редких металлов [1–5].

Такие продукты, как “Ксантан” (E415), “Курдлан” (E424), “Склероглюкан”, “Пуллулан” (E1204), выпускаемые микробиологической промышленностью в виде тонкодисперсных порошков, с успехом применяются в качестве загустителей и гелеобразователей [6].

Для получения микробных полисахаридов в виде пленки, как правило, используют бактерии *Acetobacter xylinum*. Перечисленные полисахариды синтезируются индивидуальными штаммами бактерий, которые чувствительны к условиям культивирования [7] и со-

ставу питательной среды [8–10]. Этим недостатком практически полностью лишен симбиоз уксуснокислых бактерий *Acetobacter xylinum* и дрожжей родов *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, также известный как *Medusomyces gisevii* J. Lindau. Продуктами жизнедеятельности симбиоза являются культуральная жидкость, более известная как Чайный квас, или Комбуча, и внеклеточный полимер β -1,4-глюкан, образующийся в виде пленки на поверхности культуральной жидкости. Такая пленка бактериальной целлюлозы (ПБЦ) может найти применение в медицине в качестве высокоэффективных перевязочных материалов и для создания трансдермальных терапевтических систем (ТТС) благодаря высокой эластичности, прочности и низкой адгезии ПБЦ к раневой поверхности [11, 12]. Данное вещество идентично по строению целлюлозе растений и имеет другие названия: ацетан [13], ксиллиан [14]. Симбиоз культивируют в жидкой среде, состоящей из 10 % раствора сахарозы и разбавленного чайного экстракта без дополнительного внесения в среду микроэлементов [15].

Цель работы – исследование физико-химических свойств очищенной ПБЦ, полученной при культивировании симбиоза *Medusomyces gisevii* J. Lindau и оценка возможности использования ПБЦ в качестве матрицы для ТТС, содержащих водо- и жирорастворимые лекарственные средства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биосинтез пленки бактериальной целлюлозы и очистка

Для приготовления питательной среды в стеклянную емкость помещают 100 г сахарозы и 500 мл экстракта черного чая, полученного мацерацией 2 г чайного листа (ГОСТ 1938–90) при температуре 70–90 °С в течение 15 мин, после полного растворения сахарозы объем доводят до 1 л. Среду готовят на кипяченой водопроводной воде с общей жесткостью 4.2 ммоль/дм³. Приготовленную питательную среду охлаждают до 25 °С и переносят в емкость для ферментации, после чего

вносят 30 мл 7-суточной культуры *Medusomyces gisevii* J. Lindau. Биосинтез проводят в течение 7 сут при температуре 25–29 °С в статических условиях. Полученную ПБЦ снимают и очищают.

Для очистки от растворимой золы, полифенолов чая и других лигниноподобных веществ пленку помещают в 0.5 % раствор NaOH на 24 ч при температуре 25–27 °С и периодически перемешивают. После промывки в дистиллированной воде пленку помещают в 0.5 % раствор уксусной или соляной кислоты на 24 ч, после чего промывают дистиллированной водой до получения реакции промывных вод pH 6–7 и высушивают на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Выход сухой очищенной целлюлозы составил 6.12 % (в пересчете на 100 г сахарозы).

Блок-схема получения и очистки ПБЦ представлена на рис. 1.

ИК-спектр снимали на ИК-Фурье-спектрометре “Инфралюм ФТ-801” в таблетке KBr.

Образцы бактериальной целлюлозы исследовали методом электронной сканирующей

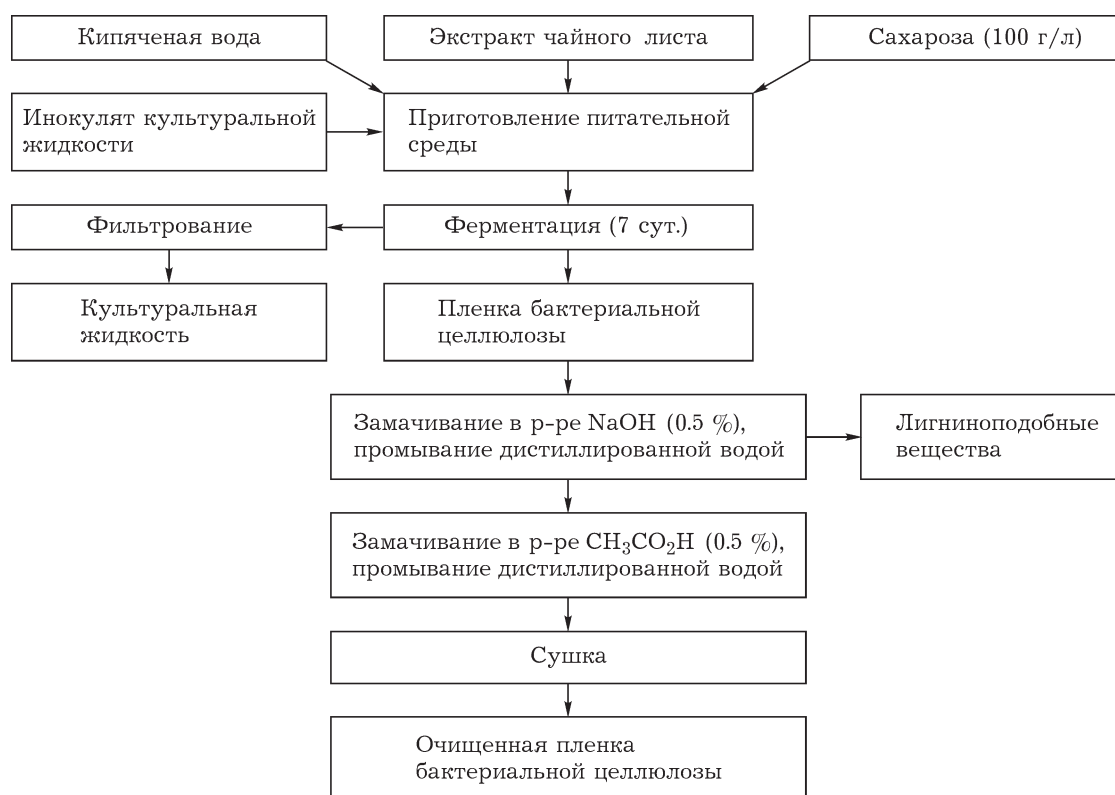


Рис. 1. Блок-схема получения пленки бактериальной целлюлозы.

микроскопии (СЭМ) на растровом электронном микроскопе JSM-840 фирмы Jeol с рентгеновским микроанализатором Link-860 серии П.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование симбиоза *Medusomyces gisevii* J. Lindau для биосинтеза гель-пленки бактериальной целлюлозы позволяет заменить многокомпонентную питательную среду, используемую для культивирования индивидуальных штаммов *Acetobacter xylinum*, на питательную среду, состоящую из раствора сахарозы и экстракта черного или зеленого чая. Кроме того, в ходе исследования симбиоза установлено, что он выделяет в результате жизнедеятельности в культуральную жидкость амилолитические ферменты. Благодаря этому, на наш взгляд, можно проводить биосинтез целлюлозы не только на гексозах, но и использовать в качестве источника углерода дисахариды или короткоцепочечные олигосахариды, которые могут быть получены гидролизом низкосортной растительной целлюлозы.

Для идентификации полученного и очищенного материала снят ИК-спектр, который имеет следующие характеристические полосы поглощения функциональных групп: 3347 см⁻¹ – валентные колебания ОН-групп, 2896 см⁻¹ – валентные колебания групп СН₂ и СН (широкая полоса свидетельствует о наличии нескольких групп), 1640 см⁻¹ – деформационные колебания Н–О–Н кристаллиза-

ционной воды, 1429 см⁻¹ – деформационные колебания групп СН₂ и СН, 1360 см⁻¹ – деформационные колебания групп СН, 1336 см⁻¹ – плоскостные деформационные колебания ОН первичной спиртовой группы; 1281 и 1205 см⁻¹ – деформационные колебания групп ОН и СН [16]; 1163 см⁻¹ – асимметричные валентные колебания моста С–О–С [17], 1060 см⁻¹ – валентные колебания связи С–О в С³Н–ОН-группе; 1029 см⁻¹ – валентные колебания связи С–О в первичной спиртовой группе в различных конформациях.

Полоса средней интенсивности в области 1429 см⁻¹ с очень слабым обертоном в области 900 см⁻¹ свидетельствует о том, что ИК-спектр соответствует высококристаллической целлюлозе I, практически идентичной хлопковой целлюлозе (ХЦ) [18].

Для определения физико-химических свойств полученной пленки использовались стандартные методы. Полученные результаты сравнительной характеристики бактериальной и хлопковой целлюлоз представлены в табл. 1. Видно, что бактериальная целлюлоза по основным параметрам качества даже превосходит хлопковую целлюлозу. Следует отметить, что использование раствора соляной кислоты вместо уксусной на стадии очистки ПБЦ позволяет значительно снизить ее зольность.

Высокие значения набухания и смачиваемости ПБЦ, а также удовлетворительно низкая адгезия к раневой поверхности (определенная органолептически) позволяют обосновать выбор ПБЦ в качестве основы для ТТС матриксного типа.

ТАБЛИЦА 1

Сравнительная характеристика бактериальной (БЦ) и хлопковой (ХЦ) целлюлоз

Физико-химические показатели (метод определения)	БЦ	ХЦ, I сорт (ГОСТ 595–79)
Влажность, % (ГОСТ 16932–93)	3.8	10.0
Зольность, % (ГОСТ 595–79)	1.0 (0.2)*	0.2
Набухание, % [19]	186.7	–
Степень полимеризации средняя, ед. (ГОСТ 9105–74)	947	716
Смачиваемость, г (ГОСТ 595–79)	179.7	140.0
Определение плотности листа, г/м ² (ГОСТ 11720–76)	80.6	–
Линейное расширение, % [19]	68.7	–
Массовая доля α-целлюлозы, % (ГОСТ 16932–71)	98.5	97.7

*Использование раствора соляной кислоты вместо уксусной на стадии очистки.

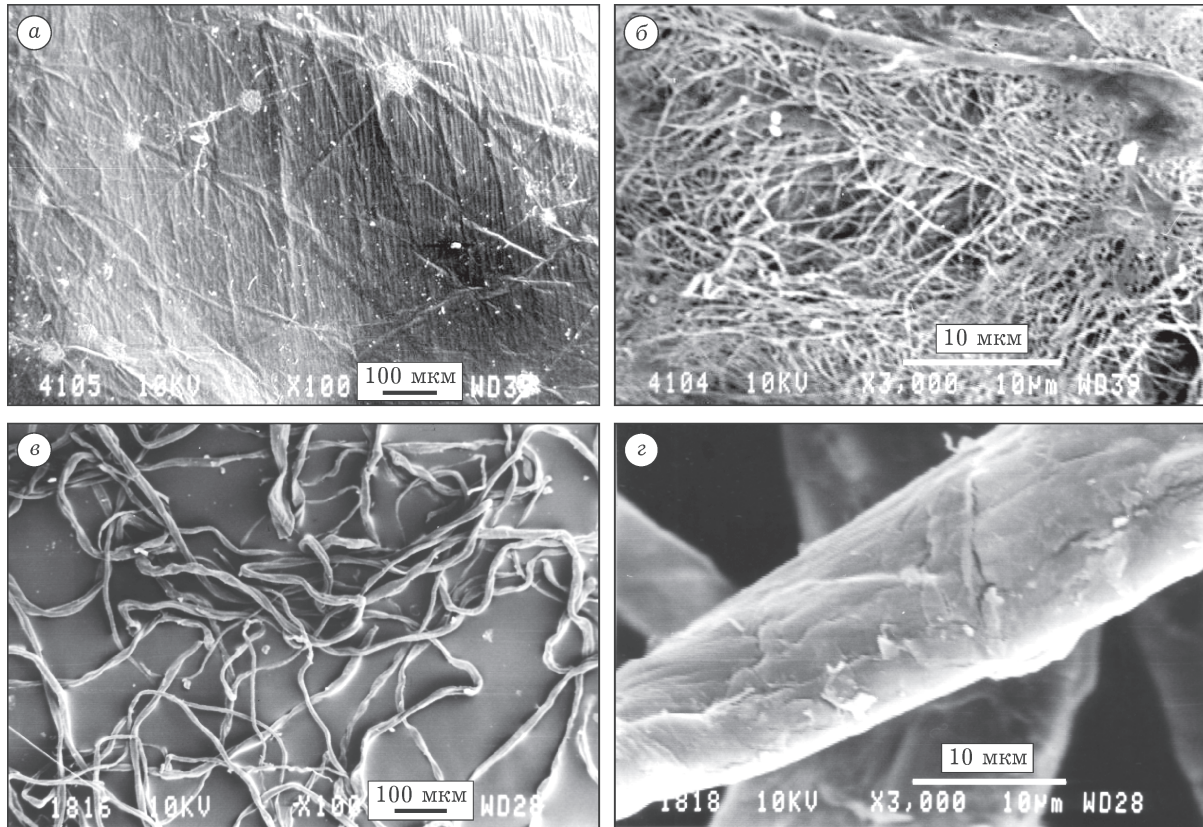


Рис. 2. Микрофотографии ПБЦ (а, б) и целлюлозы хлопка (в, з). $\times 100$ (а, в), $\times 3000$ (б, з).

Особого внимания заслуживают результаты исследования микроструктуры пленки целлюлозы, в частности, обнаружение принципиального отличия бактериальной целлюлозы от растительных видов. На рис. 2 представлены микрофотографии поверхности пленки, расположение отдельных микрофибрилл полимера относительно друг друга, а также микрофотографии целлюлозы хлопка, полученные методом СЭМ.

Видно, что, в отличие от текстильных перевязочных материалов из хлопка, поверхность пленки имеет ровную и гладкую поверхность (см. рис. 2, а). При достаточном увлажнении такая пленка будет сниматься с раны легко, не травмируя “свежий” эпителий.

Структура полученной пленки (см. рис. 2, б) образована микрофибриллами и имеет вид сетки нерегулярного строения. Причем строго параллельное расположение молекул бактериальной целлюлозы (БЦ) в кристаллических микрофибриллах, гарантированное условиями биосинтеза внеклеточного полимера, обеспечивает минимальную толщину микро-

фибрилл в единичном волокне. По нашим данным, полученным методом СЭМ, толщина единичного волокна находится в пределах 15–150 нм и намного тоньше волокон целлюлозы растений (см. рис. 2, з). Кроме того, очевидно наличие равномерного по плотности распространения волокон каркаса, что обеспечивает высокую прочность пленки.

Благодаря такому строению удастся не только обеспечить необходимую паро- и газопроницаемость, но и удержать биологически активные соединения в структуре пленки, а при контакте с поверхностью раны – постепенно высвобождать их.

Для доказательства теоретических предположений проведен ряд экспериментов по адсорбции и десорбции водных и масляных растворов биологически активных веществ. В первом случае использовали 5 % раствор ϵ -аминокапроновой кислоты – ингибитор фибринолиза; во-втором – облепиховое масло, многокомпонентное природное лекарственное средство, раствор противовоспалительных веществ плодов облепихи (каро-

тиноидов, витаминов F и E) в растительном масле.

Адсорбционные свойства ПБЦ

Соотношение твердой (ПБЦ) и жидкой фаз (5 % водный раствор ϵ -аминокапроновой кислоты (АКК) или масло облепиховое) было равным 1 : 25.

Вырезанные по шаблону образцы ПБЦ с естественной толщиной 5–7 мкм кондиционировались в течение 4 ч при относительной влажности воздуха 63–67 % и температуре 20–25 °С, взвешивались с точностью до 0.0001 г и помещались в адсорбат (раствор АКК или масло облепиховое) на 5 ч. По окончании выдержки ПБЦ вынимали и помещали на 20 мин на пористую пластину, далее высушивались в сушильном шкафу при 40 °С до постоянной массы по аналогии с термогравиметрическим методом определения влажности (ГОСТ 28561–90).

Количество адсорбата вычисляли как разность масс пропитанной ПБЦ и носителя до адсорбции. В качестве результата измерения принимали среднее арифметическое 10 параллельных измерений. Результаты определения адсорбционной емкости ПБЦ приведены в табл. 2.

Для определения скорости адсорбции проведено исследование кинетики (рис. 3).

Экспериментальные данные для обоих адсорбатов показали, что процесс практически полностью заканчивается в течение 3 ч, а характер изменения величины адсорбции указывает на полислойную адсорбцию на поверхности бактериальной целлюлозы.

Для выяснения прочности связывания молекул адсорбатов с поверхностью ПБЦ исследовали десорбцию этих веществ под влиянием буферных растворов с интервалом pH 2.0–8.0.

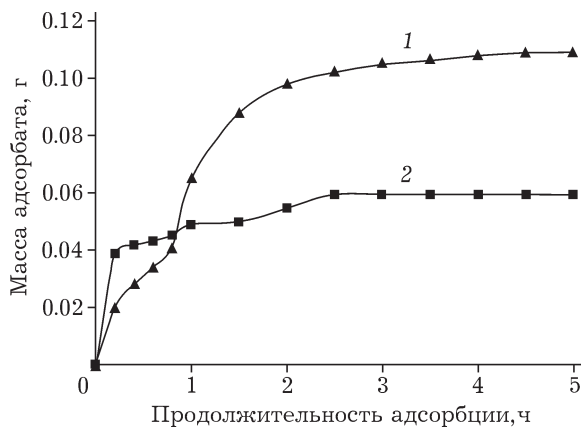


Рис. 3. Кинетика адсорбции АКК (1) и облепихового масла (2) ПБЦ.

Десорбционные свойства ПБЦ

Полученные образцы подвергали десорбции, которую проводили следующим образом. Образцы помещали в буферные растворы с pH 2.0, 3.5, 6.0, 7.2, 8.0 с соотношением твердой и жидкой фаз, равным 1 : 50, при температуре 35–40 °С. Растворы с pH 2.0 и 3.5 готовили с использованием глицинового буфера, растворы с pH 7.2 и 8.0 – фосфатного буфера, в качестве раствора с pH 6.0 использовали дистиллированную воду. Следует отметить, что взаимодействия компонентов буферного раствора с адсорбатом не происходит вследствие большого гидромодуля и низкой температуры для химических реакций. Подготовленные образцы помещали в емкость с буферным раствором, по окончании выдержки вынимали и помещали на 20 мин на пористую пластину, затем высушивали в сушильном шкафу при 40 °С до постоянной массы. После высушивания рассчитывали количество десорбированного вещества как разность масс пропитанной ПБЦ и образца после десорбции. В качестве результата измерения принимали среднее арифметическое 10 параллельных измерений.

ТАБЛИЦА 2

Адсорбционная емкость ПБЦ

Адсорбат	Продолжительность адсорбции, ч	Масса образца до адсорбции, г	Масса адсорбата, г	Адсорбция, г/г
5 % раствор АКК	5	0.1000	0.1091	1.091
Масло облепиховое	5	0.1000	0.0597	0.597

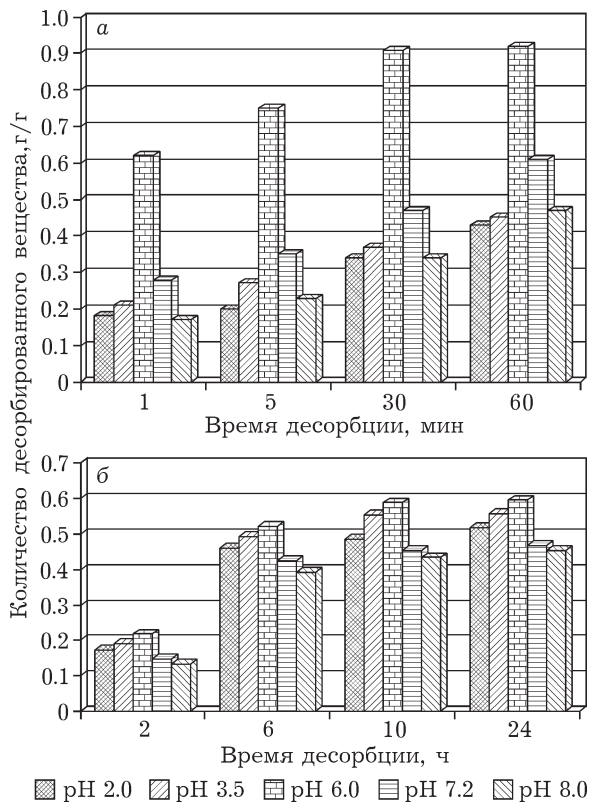


Рис. 4. Кинетика десорбции АКК (а) и облепихового масла (б) из ПБЦ. Масса АКК в образце перед десорбцией 1.091 г/г, масса облепихового масла – 0.597 г/г.

Результаты исследования десорбционных свойств ПБЦ (рис. 4) позволяют сделать вывод о том, что оба адсорбата быстрее десорбируются в раствор с pH 6.0. Процесс десорбции ϵ -аминокапроновой кислоты из пленки в буферный раствор практически полностью завершается через 1 ч. Традиционного ϵ -аминокапроновую кислоту используют в качестве кровоостанавливающего средства, поэтому такую скорость десорбции можно считать оптимальной для аппликации с кровоостанавливающим действием. Процесс выделения облепихового масла из пленки в буферный раствор практически полностью заканчивается через 24 ч, что указывает на оптимальную ско-

рость десорбции для аппликаций пролонгированного действия, а именно противоожогового.

Величина pH кожи человека изменяется от слабокислой до нейтральной, и это подтверждает возможность изготовления ТТС на основе ПБЦ, пропитанной как водными, так и масляными растворами лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы физико-химические свойства β -1,4-глюкана, полученного при культивировании *Medusomyces gisevii* J. Lindau. Отработан метод очистки получаемой пленки от нецеллюлозных примесей. Показана возможность использования ПБЦ при получении ТТС как с водорастворимыми, так и с жирорастворимыми лекарственными средствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Legge R. L. // J. Biotechnol. 1990. Vol. 8, No. 2. P. 303–319.
- Cannon R. E. // Crit. Rev. Microbiol. 1991. Vol. 17, No. 6. P. 435–447.
- Елинов Н. П. // Усп. микробиол. 1982. Т. 17, № 7. С. 158–177.
- Шамолина И. И. // Хим. волокна. 1997. № 1. С. 3–9.
- Shah J. and Broun R. M. // J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 66, No. 2. P. 352–355.
- Булдаков А. С. Пищевые добавки: Спр. М.: Дели принт, 2003. 436 с.
- Воробьева Л. И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ, 1989. 294 с.
- Pat. 4.655.758 US, 1987.
- Pat. 2141530 РФ, 1999.
- Pat. 2189394 РФ, 2002.
- Баклагина Ю. Г. // Журн. прикл. химии. 2005. № 7. С. 73–74.
- Давиденко Т. И. // Сорбенты мед. назначения. 1988. № 6. С. 10–11.
- Colguhoun I. J. // Carbohydr. Res. 1995. Vol. 262, No. 2. P. 319–331.
- Berth G. // Biopolymers. 1996. Vol. 39, No. 5. P. 709–719.
- Frank G. W. Kombucha, Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East. Its Correct Preparation and Use. Austria, Steyr: Publ. house W. Ennsthaler, 1995, 150 p.
- Mam I. // Trans. Faraday Soc. 1956. Vol. 52. P. 492–497.
- Liang C. Y. // J. Polymer Sci. 1959. Vol. 37, No. 132. P. 385–395.
- Роговин З. А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972, 520 с.
- Tarep A. A. Физико-химия полимеров. М.: Химия, 1968. 536 с.