

АННОТАЦИЯ

**Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
По специальности «БД070100-Биотехнология»**

Шокатаевой Дина Хабдулманатовны

**Пути использования бактериальной целлюлозы для создания
биокомпозитных материалов с антимикробными и пробиотическими
свойствами**

Общая характеристика диссертационной работы.

Работа посвящена обоснованию методических принципов для разработки на их базе технологии получения биокомпозитных материалов на основе бактериальной целлюлозы с антимикробными, ранозаживляющими, пробиотическими свойствами и лабораторного подтверждения их эффективности.

Актуальность темы исследования.

Конструктивные свойства бактериальной целлюлозы (БЦ): микро- и нанофибриллярная структура, высокая пористость и кристалличность создают огромный потенциал для создания на ее основе различных композитных материалов. Характерной структурной особенностью БЦ является то, что агрегаты фибрилл занимают незначительную часть объема, что позволяет вводить в БЦ не только разнообразные вещества, в том числе обладающие биологической активностью, но и клетки прокариотных или эукариотных организмов. Они придают целлюлозной матрице-носителю новые функциональные свойства. Пример такой функционализации - включение в нее веществ, обладающих антимикробной активностью. Чаще всего такие материалы применяются для создания раневых покрытий, поскольку сама БЦ служит только механическим барьером, предохраняя раневую поверхность от высыхания и поглощая продукты распада тканей. Создавая антимикробные покрытия, в гель-пленку БЦ включают антибиотики и антисептики. К сожалению, к настоящему времени, многие возбудители раневых инфекций уже имеют множественную устойчивость к антибиотикам. К антисептикам такой резистентности не возникает, но они обладают только антимикробной активностью, не обладая ранозаживляющим действием.

В связи с этим, раневое покрытие, в состав которого входит агент, обладающий помимо антимикробного действия, еще и активностью, обеспечивающей регенерацию тканей, может быть перспективным. Таким функциональным агентом может быть хитозан, который обладает антимикробной активностью и способствует регенерации тканей. В связи с этим становятся популярными комбинированные пленки, состоящие из хитозана, включенного в матрицу из БЦ.

Одним из направлений современной биотехнологии является создание лекарственных препаратов на основе биологически активных веществ, продуцируемых бактериями, в том числе представителями рода *Bacillus*. Они

продуцируют широкий спектр антибиотиков в минимальных количествах, стимулирует местный и системный иммунитет. Синтезируемые этими бактериями протеолитические ферменты способствуют регенерации тканей, обладают тромболитическим действием, препятствуют образованию рубцов, лизируют некротические ткани. В целом ряде работ приводятся данные об успешной ранозаживляющей терапии с помощью *Bacillus*. Это дает возможность использовать их для местного лечения ран и профилактики гнойных осложнений. Таким образом, продукция бактериями рода *Bacillus* широкого спектра антибиотиков и протеолитических ферментов, стимулирующих регенерационные процессы тканей, является причиной исследования возможности использования этих бактерий для функционализации раневых покрытий на основе гель-пленки БЦ.

Кроме того, согласно последним исследованиям, огромный интерес приобрело использование видов *Bacillus* и особенно *B. subtilis* (BS) в качестве пробиотиков. Эти бактерии эффективны в профилактике респираторных инфекций и желудочно-кишечных расстройств, а также в преодолении симптомов, связанных с синдромом раздраженного кишечника. Присутствие BS способствует поддержанию благоприятной сбалансированной микробиоты в кишечнике и усиливает рост и жизнеспособность пробиотических клеток молочнокислых бактерий. Есть экспериментальные и клинические доказательства того, что эти пробиотические свойства связаны с его способностью стимулировать иммунную систему и вырабатывать антимикробные вещества, или даже индуцировать сигнальные помехи против патогенных микроорганизмов. Такую целенаправленную коррекцию нарушенных биохимических и физиологических процессов за счет введения бактерий, продуцирующих биологически активные вещества, принято называть «микробной сапрофитной фармакопеей».

Успешная иммобилизация бактерий и ферментов на БЦ с сохранением и даже повышением их физиологической активности послужили основанием для проведения настоящего исследования, направленного на создание биокомпозитных материалов с антимикробными и пробиотическими свойствами путем включения в состав БЦ хитозана, клеток и экзометаболитов бактерий рода *Bacillus*.

Цель работы: Создание технологии получения и функционализации бактериальной целлюлозы для разработки композитных материалов с антимикробными, ранозаживляющими и пробиотическими свойствами.

Задачи исследования:

- отселекционировать и идентифицировать новый активный штамм-продуцент БЦ;
- модифицировать состав питательной среды на основе промышленных отходов для продуцента БЦ и исследовать структурные свойства образцов биополимера, полученных в условиях поверхностного и глубинного культивирования;
- разработать способ получения композитных материалов на основе БЦ с армирующими компонентами: хитозаном, клетками или экзометаболитами BS;

- определить биосовместимость биокomпозитных материалов в условиях *in vitro*;
- определить антимикробную активность биокomпозитных материалов;
- определить ранозаживляющую активность биокomпозитных материалов;
- изучить влияние иммобилизации бацилл в глобулы БЦ на их пробиотические свойства.

Объекты исследования: Гель-пленки и глобулы БЦ, а также экспериментальные образцы биокomпозитов с включенными в их состав хитозаном, клетками/экзoметаболитами BS.

Предмет исследования: Определение структурных особенностей, антагонистической, ранозаживляющей и пробиотической активности биокomпозитных материалов на основе матрицы БЦ для последующей разработки трансдермальных и пробиотических терапевтических систем.

Методы исследования: Получение БЦ – поверхностное и глубинное культивирование; биокomпозитов – адсорбционная и пространственная иммобилизация. Исследование структуры пленок и биокomпозитов – растровая и сканирующая электронная микроскопия. Прочность пленок – разрывная машина «Instron». ИК-спектр – Фурье-спектрометр FSM-1201. Антагонистическая активность – диффузия в агар и Time-kill тест. Биосовместимость – жизнеспособность, адгезивные свойства, метаболическая активность, морфология и пролиферация клеток мышинных фибробластов NIH3T3. Ранозаживляющая эффективность – модель резаной раны у экспериментальных животных. Пробиотическое действие – антибиотикоиндуцированный дисбактериоз.

Научная новизна результатов исследования.

Получен новый штамм-продуцент, обладающий высоким уровнем биосинтеза БЦ. Подобраны и оптимизированы условия культивирования, обеспечивающие максимальный выход целевого продукта.

Впервые разработаны биоактивные раневые покрытия на основе гель-пленки БЦ с иммобилизованными в ней клетками и метаболитами BS, обладающие пролиферативным, антисептическим, некролитическим, и антиоксидантным действием.

Впервые получены пробиотические микрогранулы БЦ/BS, предназначенные для коррекции и восстановления кишечного микробиома.

Теоретическая значимость исследований. Теоретически и экспериментально обоснован выбор состава композитных материалов антимикробного и пробиотического действия. Обоснован выбор типа сорбента – БЦ, используемой для иммобилизации спорoвых бактерий и их метаболитов.

Обозначены пути экономически эффективного способа получения БЦ и ее функционализации биологически активными компонентами для получения биосовместимых композитных материалов с высокой антимикробной, ранозаживляющей и пробиотической активностью.

Представлены возможные механизмы ранозаживляющего и пробиотического действия микробиологической основы биокomпозитов – бактерий BS.

Практическая ценность исследования. Оптимизированная питательная среда на основе отходов сахарного производства – мелассы, штамм *Komagataeibacter xylinus* С-3 и технологические условия его культивирования могут быть использованы при масштабировании получения БЦ.

Гелевые раневые покрытия из БЦ, импрегнированные хитозаном, клетками и/или экзометаболитами *Bacillus* могут найти применение в качестве элементов новой сорбционной повязки.

Пробиотические микрогранулы БЦ/BS могут быть использованы для коррекции микробиоценоза толстого кишечника.

Основные положения, выносимые на защиту:

- новая среда с мелассой, культивирование продуцента на которой обеспечивает высокий уровень биосинтеза БЦ, является экономически эффективной;

- метод «адсорбции-инкубации», используемый для поверхностной и пространственной иммобилизации BS, обеспечивает высокую концентрацию клеток на единицу объема носителя, как на поверхности, так и внутри него;

- эффективность иммобилизации клеток зависит от площади поверхности матрицы и общей пористости, которую можно увеличить путем щелочной обработки БЦ и добавления порогенов во время ее биосинтеза;

- одним из путей использования БЦ является создание биокомпозитного материала с антимикробной и ранозаживляющей активностью путем включения в БЦ-матрицу клеток BS;

- в сорбент-носитель можно включать не только живые клетки бактерий, но и их биологически активные метаболиты-метабиотики, обладающие антимикробной и протеолитической активностью;

- пространственная иммобилизация клеток в гранулы БЦ повышает их жизнеспособность и усиливает пробиотические свойства, позволяя осуществлять эффективную коррекцию кишечного дисбактериоза.

Основные результаты исследований и выводы:

Проведены комплексные исследования, посвященные созданию новых материалов с антимикробными и пробиотическими свойствами путем включения в состав матрицы-носителя БЦ функциональных ингредиентов. В результате получены и охарактеризованы биокомпозитные материалы на основе бактериальной целлюлозы, хитозана, клеток и метаболитов *Bacillus subtilis*. Применение этих композитов при лечении экспериментальных условно-чистых резаных ран у животных стимулирует репаративные процессы и позволяет сократить сроки заживления. Показано, что применение пробиотических микрогранул БЦ/BS нормализует микробиологию кишечника экспериментальных животных. Представлены возможные механизмы ранозаживляющего и пробиотического действия полученных материалов.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы:**

1. Селекционирован новый продуцент бактериальной целлюлозы, который по уровню биосинтетической активности превосходил коллекционные штаммы, рекомендованные для ее промышленного получения. Максимальный выход БЦ на стандартной среде NS в поверхностных условиях культивирования - 4,6 г/л и

6,7 г/л при глубинном.

По совокупности морфологических, культуральных, физиологических свойств и молекулярно-генетического анализа установлена его принадлежность к виду *K. xylinus*.

2. Подобран состав питательной среды на основе мелассы для продуцента БЦ, обеспечивающей снижение себестоимости синтезируемого им биополимера в 5 раз. Поверхностное культивирование штамма *K. xylinus* СЗ на среде с мелассой в течение 7 дней повышает продуктивность образования пленки до 12,8 г/л. Введение в среду для глубинного культивирования 0,04% NaAlg приводит к образованию до 12,1 г/л БЦ в виде однородных мелких гранул размером 130-140 мкм. БЦ, полученная на среде с мелассой образует сеть микро- (15-35 нм) и макрофибрилл (50-150 нм), обеспечивающих высокие механические свойства (прочность на разрыв – $37,12 \pm 0,2$ Мпа; относительное удлинение при разрыве – $3,28 \pm 0,2$ %).

3. Получено три вида биокompозитных материалов: БЦ/клетки BS; БЦ/хитозан; БЦ/хитозан/экзометаболиты BS. Включение функциональных ингредиентов проводилось путем их совместного агрегирования с гель-пленкой или глобулами БЦ. Титр жизнеспособных клеток в пленке и лиофилизированных глобулах БЦ – 10^8 /г.

4. В условиях *in vitro* определена биосовместимость композитов. Материалы, содержащие хитозан и метаболиты BS, не оказывали влияния на цитологические и пролиферативные характеристики мышинных фибробластов НИНЗТЗ. Клетки, культивируемые на среде с материалами, характеризовались высоким уровнем метаболической активности в МТТ-тесте (>85%), жизнеспособности в тесте на исключение трипанового синего (>90,1%) и ЛДГ-тесте (>85,2%), что указывало на отсутствие цитотоксичности.

5. Гель-пленки БЦ/BS и БЦ/хитозан/метаболиты BS проявляли максимальную бактерицидную активность (100%-ная гибель бактерий) через 24 часа для грамотрицательных и 10 часов для грамположительных бактерий. Армированные хитозаном гель-пленки БЦ с метабиотиком BS обладали наибольшей антагонистической активностью по отношению к возбудителям раневых инфекций: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

6. Применение полученных материалов при лечении экспериментальных условно-чистых резаных ран у лабораторных животных стимулировало репаративные процессы и сокращало сроки заживления в среднем на 24%. Максимальной терапевтической эффективностью в использованной модели раневого процесса обладал биокompозит БЦ/хитозан/экзометаболиты BS.

7. Путем пространственной иммобилизации в глобулы БЦ микроорганизма-антагониста BS получен биокompозит пробиотического действия, в 1 г которого содержится до 10^8 микробных клеток. Сорбированный пробиотик восстанавливал нормофлору кишечника лабораторных животных с антибиотикоиндуцированным экспериментальным дисбактериозом при абсолютном уменьшении и элиминации из кишечника условно-патогенных микроорганизмов. Включение клеток BS в матрицу БЦ обеспечивало их

повышенную устойчивость к бактерицидному действию желудочного сока.

Таким образом, все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Связь с планом основных научных работ.

Диссертационная работа была выполнена в рамках проекта 2679/ГФ4 «Разработка биокomпозиционных материалов на основе бактериальной целлюлозы для создания трансдермальных терапевтических систем»

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- Научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби элeмi» (14-16 апреля, 2015, Алматы);

- European Biotechnology Congress (7-9 May 2015, Bucharest, Romania);

- 6th International Weigl Conference on Microbiology (8-10 July 2015, Gdansk, Poland);

- International Conference on Advances in Management Science and Engineering (AMSE2015) (26-27 July 2015, Phuket, Thailand);

- III Международные фарабиевские чтения. Междунар. науч.-практ. конф. «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству» (Алматы, 2016);

- Междунар. науч.-практ. конф. «Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию», посв. 60-летию Института микробиологии и вирусологии. – (Алматы, 2016);

- 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life (03-08 September 2016, Kusadasi, Turkey).

- IV Международные фарабиевские чтения. Междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби элeмi» (10-11 апреля 2017, Алматы);

- V Международные фарабиевские чтения. Междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби элeмi» (10-11 апреля 2018, Алматы);

- X International Symposium «The physics and chemistry of carbon and nanoenergetic materials» (12 September 2018, Almaty);

- XV Международная научно-практическая экологическая конференция «Биологический вид в структурно-функциональной иерархии биосферы» (8–12 октября 2018, Белгород, Россия).

- The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity (1-3 July, 2021, Mugla, Turkey; Almaty, Kazakhstan);

- III международный симпозиум (27–28 мая 2021 г., Белгород, Россия);

- International Conference on Microbiology “Biology and Biotechnology of Microorganisms ICMBB 2021” (September 16-17 2021, Tashkent, Uzbekistan).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 3 статьи в рецензируемых зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus с ненулевым импакт-фактором; 1 статья в международном рецензируемом научном журнале, входящем в 1 квартиль по данным JCR в Web of Science Core Collection и, имеющая в базе данных Scopus показатель процентиля по CiteScore не менее 35; 2 статьи в международных

рецензируемых научных журналах, входящих в 3 квартиль по данным JCR в Web of Science Core Collection; 3 статьи в республиканских журналах из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки РК; 13 тезисов в материалах международных конференций; 1 патент и 1 заявка на патент Республики Казахстан. Вклад в создании статей заключается в выполнении экспериментальных исследований, работы по систематизации материала, анализе и интерпретации полученных результатов, а также оформлении текста статей. Процент авторского участия составляет около 50%.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 117 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 243 наименований. Работа включает 18 таблиц, 45 рисунков и 2 приложения.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам: рациональное использование природных, в том числе водных ресурсов, геология, переработка, новые материалы и технологии, безопасные изделия и конструкции.