

ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ И ОЦЕНКА ИХ СВОЙСТВ

Похиленко В.Д.¹, Дунайцев И.А.¹, Перелыгин В.В.¹, Лев И.О.¹, Калмантаев Т.А.¹

¹ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская обл., e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Отработаны условия получения альгинатных и хитозановых матриц с антимикробными веществами (АМВ), выделенных из *Bacillus lentus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* и *Paenibacillus polymyxa*. Исследованы зависимости формы матриц от состава используемых ингредиентов и времени нахождения в жидкости. Показано влияние способа высушивания на целостность матрикса гранул и динамику потери их активности в отношении тест-штаммов. Установлено, что лиофилизация альгинатных гранул вызывала частичную деструкцию матриц, сопровождаемую снижением антимикробного потенциала дозированной формы, что практически не наблюдалось после конвективного высушивания тех же образцов. При нахождении в воде в условиях комнатной температуры в течение месяца все варианты гранул не растворялись, но постепенно теряли активность. Более стабильные результаты по сохранению антимикробной активности показали варианты альгинатных гранул с хитозановым покрытием. Образцы чисто хитозановых микрогранул были на порядок мельче альгинатных и хорошо сохраняли активность. Полученные данные по иммобилизации лабораторных образцов АМВ природного происхождения в альгинатные и хитозановые матрицы могут быть использованы при получении систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

Ключевые слова: антимикробные вещества, бациллы, иммобилизация, альгинат, хитозан, гранулы.

IMMOBILIZATION OF ANTIMICROBIAL BACTERIAL SUBSTANCES ONTO POLYMERIC MATRICES: THEIR PROPERTY EVALUATION

Pokhilenko V.D.¹, Dunaitsev I.A.¹, Perelygin V.V.¹, Lev I.O.¹, Kalmantaev T.A.¹

¹FSIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Conditions for producing alginate and chitosan matrices carrying antimicrobial substances (AMS) isolated from *Bacillus lentus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, and *Paenibacillus polymyxa* have been worked out. The dependence of the matrix shape on ingredients used and the residence time in the liquid has been studied. Influence of the drying procedure on the granule matrix intactness as well as on the dynamics of loosing activity toward test strains by them has been shown. Lyophilization of alginate granules was found to partially destruct the matrices along with decreasing in the antimicrobial potential of the dosage form while those were practically avoided during convective drying of the same specimens. While being kept in water at room temperature for a month, granules of all versions didn't dissolve but lost gradually their activity. More consistent results for chitosan-covered alginate granules have been obtained. Specimens of chitosan microgranules were smaller by order of magnitude compared to alginate ones, retaining successfully their activities. The laboratory data on immobilizing AMS specimens of the natural origin onto alginate and chitosan matrices can be used for designing systems for target delivery of promising therapeutics.

Key words: antimicrobial substances, bacilli, immobilization, alginate, chitosan, granules.

В лечении ряда заболеваний и сопровождающих воспалительных процессов важно, чтобы высвобождение лекарства происходило постепенно, в требуемых дозах и в течение определенного времени. Для этого создают системы контролируемой доставки, используя технологию иммобилизации лекарственного средства на подходящем носителе, что является перспективным направлением биотехнологии и фармакологии.

Одним из способов модификации и улучшения потребительских свойств лекарственных средств является инкапсулирование, представляющее собой процесс

заклучения в оболочку микроскопических частиц твердых, жидких или газообразных веществ [2; 6]. Этим приемом решаются и многие проблемы, связанные с повышением устойчивости витаминных, ферментных, вакцинных, сывороточных, антимикробных препаратов, маскировкой вкуса горьких и тошнотворных лекарств, их высвобождением в нужном участке желудочно-кишечного тракта, пролонгированием действия, совмещением в одном средстве не сочетаемых между собой веществ и пр.

Инкапсулирование с использованием пленкообразователей - альгината натрия, желатина, поливинилового спирта и др. – один из широко практикуемых методов модификации как лекарственных препаратов, так и пробиотиков [12].

Цель работы – обоснование подходов к созданию эффективного способа инкапсулирования антимикробных веществ, полученных из штаммов *Bacillus lentus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* и *Paenibacillus polymyxa*, с использованием альгината натрия и хитозана.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили:

1. Антимикробное вещество – биосурфактант (далее - препарат БСФ), полученный из штамма *B. lentus* В-7150 по методике выделения в межфазную пленку [1; 4; 5]. Препарат БСФ отличается преимущественным действием на широкий спектр грамотрицательных бактерий (исключая *Pseudomonas*), устойчивостью к нагреву до 120 °С в течение 15 мин. Разрушается при сочетанном действии щелочной среды (рН 10) и автоклавирования (120 °С, 20 мин), а также протеиназой К (36 °С, 48 ч).

2. Антимикробное вещество – поверхностно-клеточный экстракт (далее - препарат ПКЭ), полученный из штамма *B. lentus* В-7150 по методике обработки бактерий водно-спиртовой смесью с последующим удалением этанола [4]. Препарат ПКЭ действует на некоторые виды грамположительных и грамотрицательных бактерий, выдерживает нагрев до 120 °С в течение 15 мин, не разрушается протеолитическими ферментами.

3. Антимикробное вещество – бактериоцин В-602 широкого спектра противобактерийного действия, полученный из штамма *P. polymyxa* В-602 [10].

4. Антигрибковое вещество – низкомолекулярный метаболит, полученный из штамма *G. thermoglucosidasius* 97 (далее - препарат Gbt-97) [3]. Препарат Gbt-97 эффективен против возбудителя микозов (*Candida albicans*), возбудителей фузариозов (*Fusarium* spp.) зерновых культур и возбудителя «снежной плесени» (*Microdochium nivale*). Выдерживает нагрев при 80 °С в течение 20 мин, устойчив к протеолизу.

Тест-штаммы: *Escherichia coli* М17, *Listeria monocytogenes* 776, *Fusarium* spp., *Microdochium nivale* 4995, *Candida albicans* РКПГУ 1244/CBS-8837.

Иммобилизация веществ в альгинатные шарики. Приготовление объектов грануляции проводили растворением антимикробных веществ (АМВ) во взвешивающей среде в виде жидкого концентрата либо сухого вещества. В первом случае по 5 мл раствора АМВ смешивали с 10 мл 2%-ного раствора альгината натрия (Acros Organic, Бельгия). Во втором случае в альгинате указанной концентрации растворяли 200 мг навески АМВ. Для увеличения растворимости вещества в альгинат дополнительно вводили 0,1% неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) Triton X-100 (Serva). Смеси альгината с АМВ заправляли в разовые 10 мл шприцы и капали с высоты около 15 см через 0,8 мм иглы в 0,55%-ный раствор CaCl_2 . После 30 мин полимеризации образовавшиеся шарики вынимали из раствора, промывали дистиллятом, сливали воду и во флаконах помещали в холодильник. Одну часть гранул оставляли без изменений, вторую покрывали хитозановой мембраной.

Покрытие альгинатных шариков мембраной из хитозана. Для получения рабочего раствора 2 г хитозана пищевого кислоторастворимого (ООО «Биопрогресс», Московская обл., п. Биокомбината) вносили в 95 мл дистиллированной воды с 1 мл ледяной уксусной кислоты (Россия), смесь инкубировали при температуре 60 °С в течение 1 часа и после фильтровали через плотную хлопчатобумажную ткань - бязь. В полученный раствор хитозана после коррекции рН до 6,0 с помощью 1 моль/л NaOH вносили при перемешивании альгинатные гранулы с АМВ (около 12 г/100 мл) и выдерживали в течение около 30 мин. Гранулы вынимали из раствора хитозана, промывали дистиллированной водой и собирали в стеклянные флаконы для последующего высушивания и анализа.

Микрокапсулирование с хитозаном. Проводили методом эмульгирования водного раствора АМВ в масле с последующим разделением фаз и сбором целевой фракции [11]. Для получения водной фазы в стакан с 20 мл водного раствора хитозана (Х), приготовленного как описано выше, вносили с перемешиванием 5 мл раствора бактериоцина В-602. Для получения масляной фазы в стакан с 1 мл Triton X-100 вносили 80 мл парафинового (вазелинового) масла (Тульский фармзавод, Россия) и перемешивали на магнитной мешалке при 50 °С до растворения ПАВ. Затем туда медленно вводили водный раствор бактериоцина с хитозаном и после по каплям еще 25 мл 2%-ной лимонной кислоты как сшивающего агента. Образовавшуюся эмульсию дополнительно гомогенизировали 5 минут при 900-1000 об/мин на смесителе пропеллерного типа «MLM» (Венгрия) с последующей экспозицией при температуре 40 °С и постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа. Далее гомогенизат заливали в делительную воронку, закрепленную на штативе, и оставляли при комнатной температуре на 3 дня. После полного расслоения фаз избыток масляной фазы (внизу) сливали, а эмульсию с микрогранулами декантировали и промывали гексаном при

центрифугировании (5000 об/мин) в течение 10 мин и заливали водой для последующего использования в исследованиях.

Высушивание гранул. Для лиофилизации флаконы с различными вариантами приготовленных гранул замораживали при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч, помещали в камеру сублимационной установки Virtis BT-4k (США) и высушивали в течение 20 ч. Для конвективного обезвоживания альгинатные гранулы раскладывали монослоем на чистую ткань типа бязь на решетке сушилки «Суховей» (Россия), выдерживали при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5-2 ч. Хитозановые микрогранулы высушивали в тех же условиях за исключением того, что они помещались в стеклянные чашки, которые накрывали слоем ткани во избежание их уноса с потоком воздуха. Сухие гранулы собирали и перекладывали в стерильные флаконы, которые закрывали резиновыми пробками, фиксировали металлическими колпачками и помещали в холодильник для хранения и последующего изучения.

Контроль выхода веществ из гранул. Во флаконы с различными вариантами сухих гранул вносили по 5 мл стерильного физраствора и оставляли для обводнения на 20 мин. Затем из каждого флакона отбирали по 3-5 гранул (опытных и контрольных) и накладывали их на чашки Петри со свежесезяемыми газонами тест-штаммов. Такую же процедуру повторяли через сутки-двое в течение месяца. Чашки с посевами инкубировали при температуре $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 ч, учитывая наличие и величину зоны ингибирования тест-штаммов.

Контроль целостности гранул в жидкости. Содержимое каждого флакона выливали в стерильные стаканы диаметром 40 мм и подсчитывали распределившееся монослоем количество гранул с измененной формой, соотнося их к числу с интактной морфологией в процентном выражении по формуле:

$$K = (n_i/n_0) \times 100,$$

где K – коэффициент изменения формы, %;

n_i – количество измененных гранул;

n_0 – количество исходных гранул.

По результатам определений строили графические зависимости разрушения гранул от времени нахождения гранул в жидкости и проявления у них антимикробной активности.

Определение размера гранул. Размер альгинатных гранул определяли с помощью линейки и/или штангенциркуля, а хитозановых микрогранул - в препарате «раздавленная капля» под световым микроскопом, снабженным винтовым окулярным микрометром и объект-микрометром.

Все опыты проводили в трех повторностях и в расчет принимали средние их значения.

Результаты исследований и их обсуждение

При инкапсулировании образцов было установлено, что размер и внешний вид гранул различались в зависимости от условий введения АМВ в альгинат (жидкость-жидкость, порошок-жидкость) и последующего их высушивания. Так, сырые гранулы, приготовленные по варианту «жидкость-жидкость» (Ж:Ж) имели размер $2,5\pm 0,3$ мм (рис. 1а). Несколько крупнее ($2,9\pm 0,3$ мм) получались сферы по варианту «порошок-жидкость» в случае введения в альгинат сухого порошкового (П) АМВ (рис. 1б). Еще более крупными ($3,1\pm 0,2$ мм) были гранулы, полученные по варианту «П:Ж с ПАВ+Х» при котором дополнительно использовали поверхностно-активное вещество (ПАВ) тритон X100 в количестве 0,1% и выдерживание в растворе хитозана (рис. 1в). Лиофилизация приводила к частичному разрушению альгинатных шариков (рис. 2 б, в) что практически не наблюдали после их конвективного высушивания (рис. 2г).

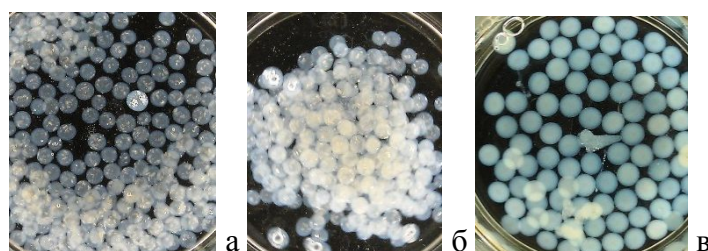


Рис. 1. Вид альгинатных гранул, приготовленных из жидкого (а), сухого (б, в) БСФ, а также его варианта с ПАВ и дополнительным покрытием хитозаном (в)



Рис. 2. Альгинатные гранулы с АМВ *B. lentus* B-7150 до (а) и после высушивания методом лиофилизации (б, в) и тепловой конвекции (г)

Все варианты гранул, как показали результаты тестирования, не распались, но несколько видоизменялись при нахождении в воде в условиях комнатной температуры в течение месяца (рис. 3 а, б, в). Морфологически наиболее стабильными были гранулы, полученные с использованием тритон X100 и хитозана (рис. 3г, 4).

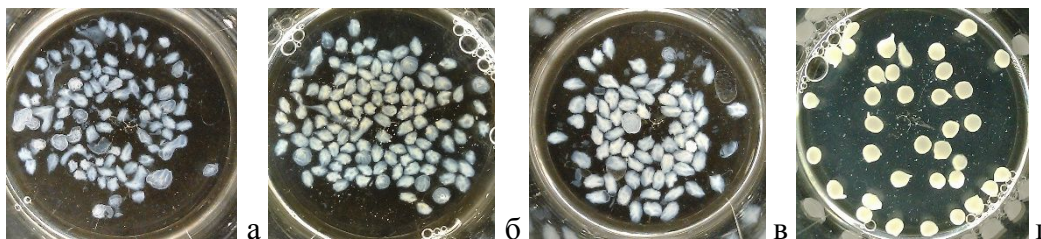


Рис. 3. Варианты альгинатных гранул после месяца нахождения в воде при комнатной температуре, приготовленных из: жидкого вещества (а), то же - с хитозаном (б), порошка вещества (в), то же – с тритон X100 и хитозаном (г)

Биологическое тестирование показало, что антимикробная активность (АА) сохраняется на всех стадиях приготовления образцов гранул: смешивания АМВ с раствором полимера, в процессе и после инкапсулирования (рис. 5а, б), высушивания и регидратации (рис. 5 б, в). При этом в контрольных гранулах, не содержащих АМВ, антимикробная активность не выявлялась (рис. 5б, 6, 7).

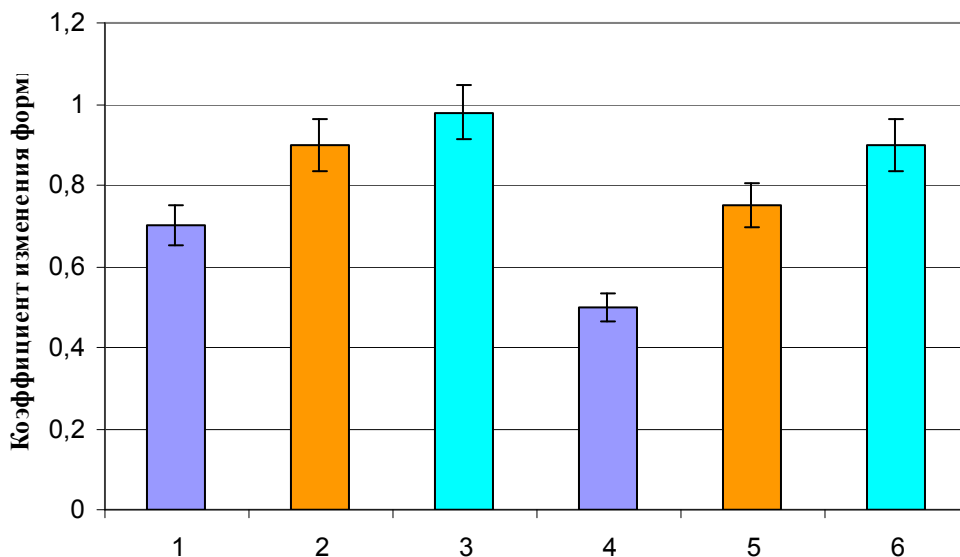


Рис. 4. Изменение формы альгинатных гранул в зависимости от способа их подготовки и введения антимикробных веществ.

Столбцы 1, 2, 3 – параметры сырых гранул; 4, 5, 6 – после сушки; 1 и 4 – гранулы, приготовленные введением в альгинат раствора АМВ-СФ (вариант Ж:Ж), 2 и 5 – то же, порошка (вариант П:Ж); 3 и 6 – до введения порошка АМВ альгинат был предварительно модифицирован 0,1% ПАВ, а сырые гранулы до их сушки выдержаны в растворе хитозана (вариант П:Ж с ПАВ+Х)

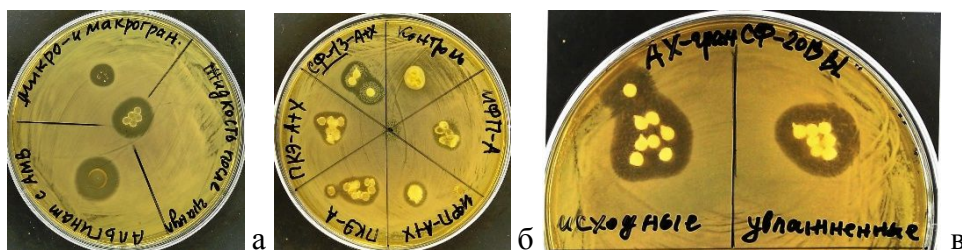


Рис. 5. Проявление активности образцов АМВ на основе *V. lentus* B-7150 против тест-штамма *E. coli* M17 в процессе инкапсулирования, после высушивания и увлажнения: а) чашка с пробами исходной смеси «альгинат+АМВ» (слева внизу), полученных из них гранул (в центре), жидкости после промывки гранул (справа внизу) и хитозановых микрогранул (верх); б) чашка с лиофилизированными образцами альгинатных гранул с пятью вариантами действующих веществ и контролем (без них); в) чашка с конвективно высушенными и увлажненными альгинатными гранулами, содержащими БСФ

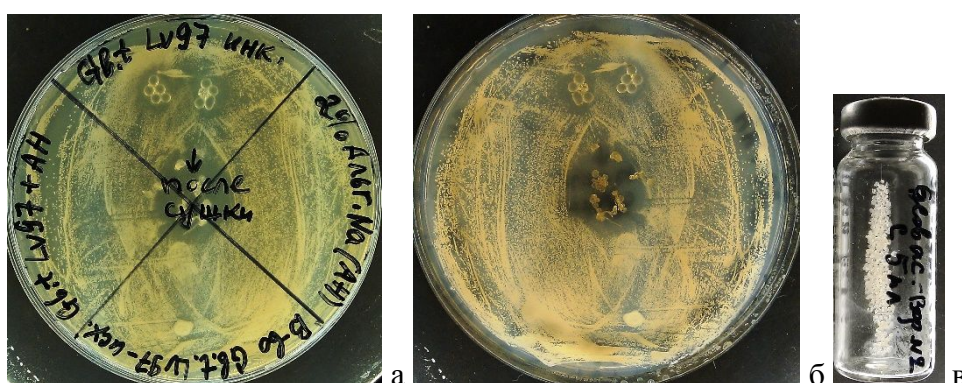


Рис. 6. Проявление активности антигрибкового вещества Gbt-97 на основе *G. thermoglucosidasius* 97 против тест-штамма *C. albicans* в процессе инкапсулирования, после высушивания и увлажнения: а) вид чашки с пробами (по часовой стрелке) альгината натрия, противогрибкового вещества, его смеси с альгинатом и в гранулах (сырых – сверху, высушенных – в центре) со стороны доннышка; б) вид той же чашки со стороны крышки; гранулы, использованные в опыте (в)

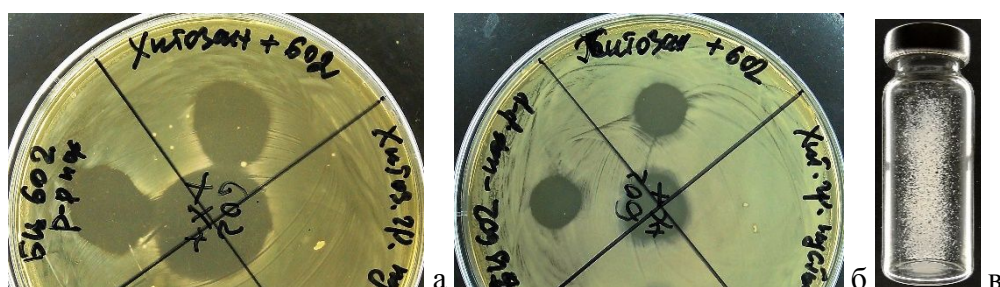


Рис. 7. Проявление активности хитозановых микрогранул с бактериоцином *P. rolytuxa* B-602 против тест-штаммов *L. topocytogenes* 776 (а) и *E. coli* M17 (б) в процессе получения. Пробы на чашках (по часовой стрелке): хитозановые микрогранулы без АМВ 602, раствор рабочий 602 и микрогранулы с ним. В центре – неразбавленный 602. Микрогранулы (в)

Установлено, что динамика снижения противобактерийной активности гранул зависела от состава действующего начала (рис. 8) и способа их высушивания (рис. 9). На примере биосурфактанта *V. lentus* было выявлено, что активность альгинатных гранул,

покрытых хитозаном и высушенных методом тепловой конвекции, сохранялась более длительно. Также отличались высокой стабильностью и чисто хитозановые гранулы.

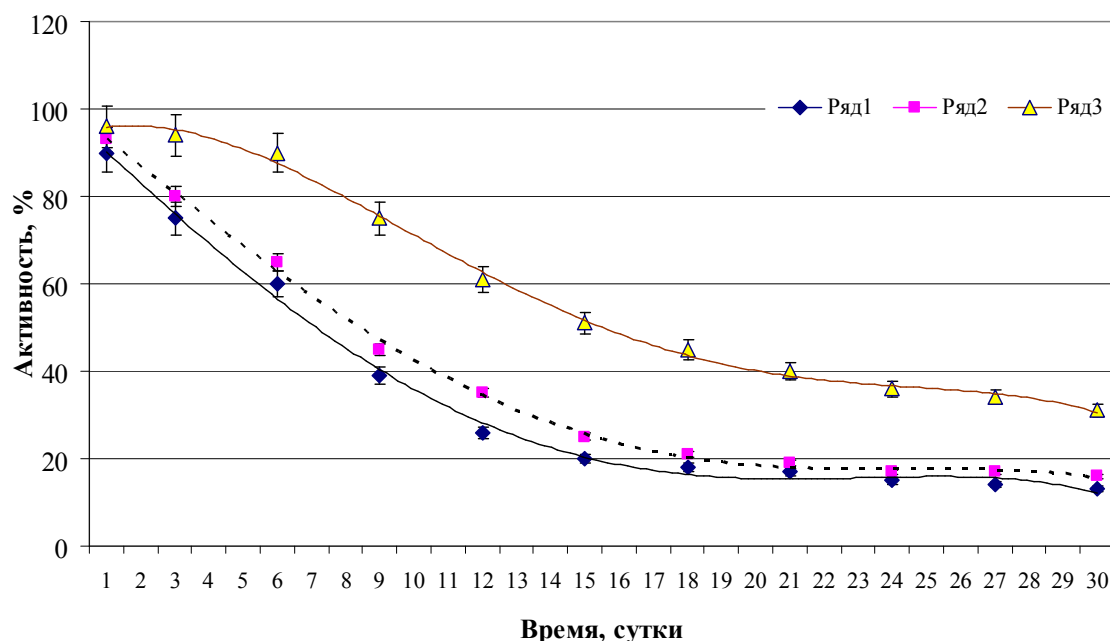


Рис. 8. Динамика изменения активности альгинатных гранул в зависимости от состава антимикуробного вещества *B. lentus*. Ряд 1 – ИФП-А; ряд 2 – ПКЭ-А+Х; ряд 3 – СФ-А+П+Х

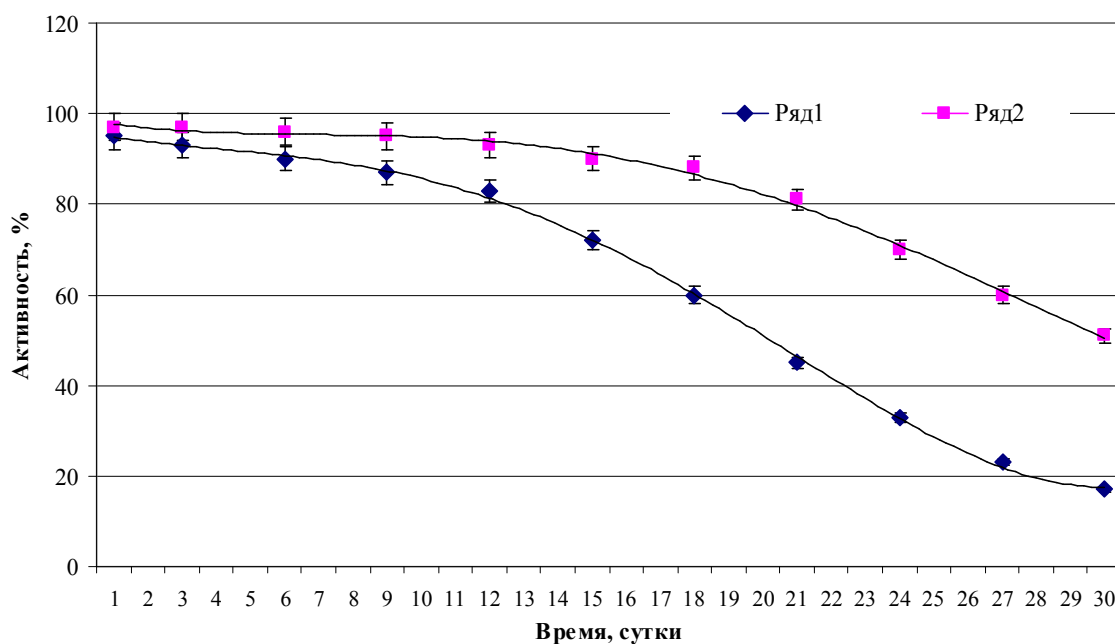


Рис. 9. Динамика изменения активности альгинатных гранул с антимикуробным веществом на основе *B. lentus* в зависимости от способа их высушивания. Ряд 1 – ПКЭ-А+Х после лиофилизации; ряд 2 – ПКЭ-А+Х после конвективного высушивания

Таким образом, в результате проведенных исследований были отработаны условия получения альгинатных и хитозановых гранул с антимикуробными веществами естественного происхождения, выделенными из представителей спорообразующих бактерий – *B. lentus*, *Gb. thermoglucosidasius* и *P. polymyxa*. Выбор указанных веществ для инкапсулирования в полимерные носители был обусловлен натуральностью их происхождения и

оригинальностью, активностью против представителей бактерий и грибов, а также перспективностью как потенциальных моделей для совершенствования материалов и методов борьбы с опасными микроорганизмами. Альгинат натрия и хитозан с успехом используются для доставки лекарств через нос [7], слизистые мембраны глаз [9], а также ротовую полость [8].

Выводы

Исследованы зависимости формы получаемых матриксов из альгината натрия от состава используемых ингредиентов и времени пребывания в жидкости.

Установлено, что лиофилизация альгинатных гранул вызывает частичную деструкцию матриксов, сопровождаемую снижением антимикробного потенциала дозированной формы, что не происходит после их конвективного высушивания.

Наиболее стабильные результаты по устойчивости к распаду и сохранению антимикробной активности показали варианты альгинатных гранул с хитозановым покрытием.

Результаты выполненных исследований позволили выбрать методические подходы к созданию эффективного способа капсулирования антимикробных веществ бациллярного происхождения как доступных моделей при создании систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

Работа была выполнена по теме: «Разработка технологии инкапсулирования и контролируемого высвобождения антимикробных субстанций для борьбы с опасными патогенами человека» в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Список литературы

1. Калмантаев Т.А., Садикова Г.Т., Перельгин В.В., Похиленко В.Д. Бактериоциноподобное вещество *Bacillus circulans* и способ его получения // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - № 2 (18). - С. 52-65.
2. Кролевец А.А., Тырсин Ю.А., Быковская Е.Е. Применение нано- и микрокапсулирования в фармацевтике и пищевой промышленности. Часть 2. Характеристика инкапсулирования // Вестник Российской академии естественных наук. - 2013. - № 1. – С. 77-84.
3. Лев И.О., Дунайцев И.А., Похиленко В.Д. Возможности использования низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов и бактериальных метаболитов в качестве

природных антимикробных средств // Общественная научная организация «Наука и хозяйство». - 2015. - № 5 (10). – С. 20-24.

4. Похиленко В.Д., Перельгин В.В., Садикова Г.Т., Лунева Н.И., Мицевич И.П. Штамм *Bacillus lentus* – продуцент бактериоциноподобной субстанции антимикробного действия и способ получения бактериоциноподобной субстанции : Патент России № 2530552. - 2014. Бюл. № 30.

5. Храмов В.М., Калмантаев Т.А., Садикова Г.Т., Перельгин В.В., Похиленко В.Д. Антимикробный комплекс пептидной природы *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2015. - № 1 (29). - С. 37-55.

6. Bon Bojana, Šumiga Boštjan. Microencapsulation Technology and its Applications in Building Construction Materials // Materials and Geoenvironment. - 2008. - V. 55 (3). - P. 329-344.

7. Casettari L., Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs // Journal of Controlled Release. - 2014. - V. 190. - P. 189-200.

8. Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria // Biomacromolecules. - 2011. - V. 12 (7). - P. 2834-2840.

9. Koland M., Charyulu R.N., Vijayanarayana K., Prabhu P. In vitro and in vivo evaluation of chitosan buccal films of ondansetron hydrochloride // Int. J. Pharm. Investig. - 2011. - V. 1 (3). - P. 164-171.

10. Stern N., Svetoch E., Eruslanov B., Kovalev Y.N., Volodina L.I., Perelygin V.V. et al. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* Strains Inhibitory to *Campylobacter jejuni* and Characterization of Associated Bacteriocins // J. Food Protection. - V. 68 (1). – P. 11–17.

11. Varshosaz J., Alinagari R. Effect of citric acid as cross-linking agent on insulin loaded chitosan microspheres // Iranian Polymer Journal. – 2005. – V. 14 (7). – P. 647-656.

12. Zhou Y., Martins E., Groboillot A., Champagne C.P., Neufeld R.J. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating // Journal of Applied Microbiology. - 1998. - V. 84. - P. 342–348.