

АҢДАТПА
"6D070100-Биотехнология" мамандығы бойынша
Философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін диссертация

Шокатаева Дина Хабдулманатовна

Антимикробтық және пробиотикалық қасиеттері бар биокомпозиттік материалдар құрастыру үшін бактериялық целлюлозаны пайдалану жолдары

Диссертациялық жұмыстың жалпы сипаттамасы.

Жұмыс әдістемелік принциптерді негіздеуге және олардың негізінде антимикробтық, жараларды емдейтін, пробиотикалық қасиеттерге ие бактериялық целлюлоза негізінде биокомпозиттік материалдарды алу технологиясын жасауға және олардың тиімділігін зертханалық растауға арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі.

Бактериялық целлюлозаның (БЦ) құрылымдық ерекшеліктері: микро және нанофибриллярлы құрылымы, жоғары кеуектілігі және кристалдылығы оның негізінде әртүрлі композиттік материалдарды жасау үшін үлкен әлеует жасайды. БЦ-ға тән құрылымдық ерекшелігі - фибрилл агрегаттары көлемнің аз бөлігін алады, бұл БЦ-ға әртүрлі заттарды, соның ішінде биологиялық белсенділігі бар заттарды ғана емес, сонымен қатар прокариотты немесе эукариотты организмдердің жасушаларын да енгізуіне мүмкіндік береді. Олар целлюлоза матрицасына жаңа функционалды қасиеттер береді. Мұндай функционализацияның мысалы – антимикробтық белсенділігі бар заттардың қосылуы. Көбінесе мұндай материалдар жараның жабындарын жасау үшін қолданылады, өйткені БЦ өзі тек механикалық тосқауыл ретінде қызмет етіп, жараның бетін кебуден қорғайды және ұлпаның ыдырау өнімдерін сіңіреді. Антимикробтық жабынды жасай отырып, БЦ гель пленкасына антибиотиктер мен антисептиктер енгізіледі. Өкінішке орай, қазіргі уақытта көптеген жара инфекцияларының қоздырғыштары антибиотиктерге бірнеше төзімділікке ие. Антисептиктерге мұндай төзімділік пайда болмайды, бірақ олар тек антимикробтық белсенділікке ие, жараларды емдейтін әсері жоқ.

Осыған байланысты антимикробтық әсерден басқа, ұлпалардың қалпына келуін қамтамасыз ететін белсенділігі бар агентті қамтитын жара жабыны перспективалы болуы мүмкін. Мұндай функционалды агент антимикробтық белсенділігі бар және ұлпалардың қалпына келуіне ықпал ететін хитозан болуы мүмкін. Осыған байланысты БЦ матрицасына енгізілген хитозаннан тұратын аралас жабындар танымал бола бастады.

Қазіргі заманғы биотехнологияның перспективалы бағыттарының бірі бактериялар шығаратын биологиялық белсенді заттар негізінде дәрілік препараттар жасау, оның ішінде *Bacillus* тұқымының өкілдері болып табылады. Олар антибиотиктерді кең спектрде, бәрақ аз мөлшерде шығарып, жергілікті және жүйелік иммунитетті ынталандырады. Осы бактериялармен

синтезделетін протеолитикалық ферменттер ұлпалардың регенерациясына ықпал етеді, тромболитикалық қолданылуы бар, тыртықтардың пайда болуына кедергі етіп, шірік ұлпалардың лизисіне алып келеді. Бірқатар жұмыстарда *Bacillus* өсінділерінің көмегімен жараларды емдеудің сәтті терапиясы туралы мәліметтер келтірілген. Бұл жараларды жергілікті емдеу және іріңді асқынулардан алдын алу үшін пайдалануға мүмкіндік береді. Ұлпалардың қалпына келу процестерін ынталандыратын антибиотиктер мен протеолитикалық ферменттердің кең спектріндегі *Bacillus* бактерияларының өндірісі осы бактерияларды БЦ гель пленкасы негізіндегі жаралардың функционализациясы үшін қолдану мүмкіндігін зерттеуге себеп болады.

Сонымен қатар, соңғы зерттеулерге сәйкес, *Bacillus* және әсіресе *B. Subtilis* (BS) түрлерін пробиотиктер ретінде қолдану үлкен қызығушылық тудырды. Бұл бактериялар тыныс жолдарының инфекциясы мен асқазан-ішек ауруларының алдын-алуда, сондай-ақ тітіркенген ішек синдромымен байланысты белгілерді жеңуде тиімді. *B. subtilis*-тің болуы ішекте қолайлы микробиотаны сақтауға көмектеседі және сүтқышқылды бактерияларының пробиотикалық жасушаларының өсуі мен өміршеңдігін арттырады. Сондай-ақ, бұл пробиотикалық қасиеттер иммундық жүйені және антимикробтық заттарды өндіруді ынталандыру немесе тіпті қоздырғыштарға қарсы сигналдық кедергілерді тудыратын қабілетімен байланысты деген болжам айтылды. Биологиялық белсенді заттарды шығаратын қажетті бактерияларын енгізу арқылы бұзылған биохимиялық және физиологиялық процестерді осындай мақсатты түзету әдетте "микробтық сапрофиттік фармакопея" деп айтады.

Бактериялар мен ферменттердің БЦ-ға сәтті иммобилизациясы олардың физиологиялық белсенділігін сақтай отырып және тіпті арттыра отырып, БЦ құрамына хитозанды, жасушалар мен экзометаболиттерді *Bacillus* тектес бактерияларды қосу арқылы антимикробтық және пробиотикалық қасиеттері бар биокомпозиттік материалдарды жасауға бағытталған осы зерттеуді жүргізу үшін негіз болды.

Жұмыстың мақсаты: Антимикробтық, жараларды емдеу және пробиотикалық қасиеттерге ие композиттік материалдарды жасау үшін бактериялық целлюлозаны алу және функционализациялау технологиясын құру.

Зерттеу міндеттері:

- жаңа белсенді БЦ штамм-продуцентін анықтау және бөлу;
- БЦ продуценті үшін өнеркәсіптік қалдықтар негізінде қоректік орта құрамын әзірлеу және жер үсті және терең культивациялау жағдайында алынған биополимер үлгілерінің құрылымдық қасиеттерін зерттеу;
- арматуралаушы компоненттері: хитозан, BS жасушалары немесе экзометаболиттері бар БЦ негізінде композиттік материалдарды алу тәсілін әзірлеу;
- *in vitro* жағдайында биокомпозиттік материалдардың биожетімділігін анықтау;

- биокөмпозиттік материалдардың антимикробтық белсенділігін анықтау;

- биокөмпозиттік материалдардың жараны емдейтін белсенділігін анықтау;

-бациллалардың БЦ глобулаларына иммобилизациясының олардың пробиотикалық қасиеттеріне әсерін зерттеу.

Зерттеу объектілері: БЦ гель-қабыршақтары мен глобулалары, сондай-ақ оның құрамына хитозан, BS жасушалары мен экзометаболиттері қосылған биокөмпозиттердің эксперименттік үлгілері.

Зерттеу пәні: тарнсдермалдық және пробиотикалық терапиялық жүйелерді кейіннен әзірлеу үшін БЦ матрицасы негізінде биокөмпозиттік материалдардың құрылымдық ерекшеліктерін, антагонистік, жараларды емдеу және пробиотикалық белсенділігін анықтау.

Зерттеу әдістері: БЦ алу - жер үсті және терең культивация; биокөмпозиттер – адсорбциялық және кеңістіктік иммобилизация. Қабыршақтар мен биокөмпозиттердің құрылымын зерттеу-растрлық және сканерлеуші электронды микроскопия. Пленкалардың беріктігі - "Instron" жару машинасы. IR спектрі-FSM-1201 Фурье-спектрометрі. Антагонистік белсенділік – агар мен Time-kill тестіндегі диффузия. Биожетімділік-өміршеңдік, жабысқақ қасиеттер, метаболикалық белсенділік, морфология және НИЗТЗ тышқан фибробласттары жасушаларының көбеюі. Жараларды емдеудің тиімділігі-тәжірибелік жануарлардағы кесілген жараның моделі. Пробиотикалық-әрекет – антибиотикоиндуциондық дисбактериоз.

Зерттеу нәтижелерінің ғылыми жаңалығы.

БЦ биосинтезінің жоғары деңгейіне ие жаңа штамм-продуцент алынды. Мақсатты өнімнің максималды шығымдылығын қамтамасыз ететін өсіру шарттары таңдалды және оңтайландырылды.

Алғаш рет БЦ гель-пленкасының негізінде иммобилизацияланған *Bacillus subtilis* жасушалары және пролиферативті антисептикалық, некролиттік және антиоксиданттық әсері бар биобелсенді жара жабындары әзірленді.

Алғаш рет ішек микробиомасын түзетуге және қалпына келтіруге арналған БЦ/BS пробиотикалық микрогранулалар алынды.

Зерттеудің теориялық маңыздылығы. Теориялық және тәжірибелік тұрғыдан антимикробтық және пробиотикалық әрекеттің көмпозиттық материалдарының құрамын таңдау негізделген. Споралық бактериялар мен олардың метаболиттерін иммобилизациялау үшін қолданылатын сорбент – БЦ таңдауы негізделген.

БЦ алудың экономикалық тиімді әдісі және оның антимикробтық, жараларды емдейтін және пробиотикалық белсенділігі жоғары биосәйкес көмпозитті материалдарды алу үшін биологиялық белсенді компоненттермен жұмыс істеу жолдары көрсетілген.

Биокөмпозиттердің микробиологиялық негізі - BS бактерияларының жараны емдейтін және пробиотикалық әсерінің мүмкін механизмдері ұсынылған.

Зерттеудің практикалық құндылығы. Қант өндірісінің қалдықтарына негізделген оңтайландырылған қоректік орта – меласса, *Komagataeibacter xylinus* С-3 штаммы және оны өсірудің технологиялық шарттары БЦ өнеркәсіптік өндірісі үшін пайдаланылуы мүмкін.

Хитозан жасушаларымен және/немесе *Bacillus* экзометаболиттерімен сіңдірілген БЦ гель жаралары жаңа сорбциялық таңғыштың элементтері ретінде қолданыла алады.

БЦ/BS пробиотикалық микрогранулаларды тоқ ішектің микробиоценозын түзету үшін пайдалануға болады.

Қорғауға шығарылатын негізгі ережелер:

- БЦ биосинтезінің жоғары деңгейін қамтамасыз ететін продуцентті культивациялау, мелассасы бар жаңа орта экономикалық тиімді болып табылады;

- BS беттік және кеңістіктік иммобилизациясында қолданылатын "адсорбция-инкубация" әдісі бетінде де, ішінде де тасымалдаушы көлемінің бірлігіне жасушалардың жоғары концентрациясын қамтамасыз етеді;

- жасушалардың иммобилизациясының тиімділігі матрицаның беткі ауданы және жалпы кеуектілік сияқты параметрлеріне байланысты, оны БЦ сілтілі өңдеу және оның биосинтезі кезінде шекті қосу арқылы көбейтуге болады;

- БЦ пайдалану жолдарының бірі BS жасушаларының БЦ-матрицасына қосу жолымен антимикробтық және жараны емдейтін белсенділігі бар биокомпозиттік материал жасау болып табылады;

- сорбент-тасымалдағышқа бактериялардың тірі жасушаларын ғана емес, сондай-ақ антимикробтық және протеолитикалық белсенділігі бар олардың биологиялық белсенді метаболиттерін де қосуға болады;

- БЦ гранулалары жасушалардың кеңістіктік иммобилизациясы олардың өміршеңдігін арттырады және пробиотикалық қасиеттерін күшейтеді, бұл ішек дисбиозын тиімді түзетуге мүмкіндік береді.

Зерттеудің негізгі нәтижелері мен қорытындылары:

БЦ матрицасының тасымалдаушысының құрамына функционалдық ингредиенттерді қосу арқылы антимикробтық және пробиотикалық қасиеттері бар жаңа материалдарды жасауға арналған кешенді зерттеулер жүргізілді. Нәтижесінде бактериалды целлюлоза, хитозан, *Bacillus subtilis* жасушалары мен метаболиттеріне негізделген биокомпозиттік материалдар алынды және сипатталды. Бұл композиттерді жануарларда эксперименттік шартты таза кесілген жараларды емдеуде қолдану репаративті процестерді ынталандырады және емделу уақытын қысқартады. БЦ/*Bacillus subtilis* пробиотикалық микрогранулаларын қолдану тәжірибелік жануарлардың ішек микроэкологиясын қалыпқа келтіретіні көрсетілген. Алынған материалдардың жараларды емдеу және пробиотикалық әсерінің мүмкін механизмдері ұсынылған.

Алынған нәтижелер келесі **қорытынды** жасауға мүмкіндік береді:

1. Бактериялық целлюлозаның жаңа продуценті алынды, ол өнімділік тұрғысынан оны өнеркәсіптік өндіруге ұсынылған коллекциялық

штамдардан асып түседі. Жер үсті өсіру жағдайларында стандартты HS ортасында БЦ - ның максималды шығымы-4,6 г/л және тереңдігі 6,7 г/л.

Морфологиялық, мәдени, физиологиялық қасиеттер мен молекулалық-генетикалық талдаудың жиынтығы бойынша оның *K. xylinus* түрлеріне жататындығы анықталды.

2. Ол синтезделген биополимердің құнын 5 есе төмендетуді қамтамасыз ететін БЦ өндірушісі үшін меласса негізінде қоректік ортаның оңтайлы құрамын жасады. *Komagataeibacter xylinus* С3 штаммын 7 күн ішінде меласса бар ортада өсіру пленканың өнімділігін 12,8 г/л дейін арттырады, 0,04% NaAlg терең культивациялануы үшін ортаға енгізу 130-140 мкм біртекті ұсақ гранулалар түрінде 12,1 г/л дейін БЦ пайда болуына әкеледі. Мелассасы бар ортада алынған БЦ механикалық беріктіктің жоғары дәрежесін қамтамасыз ететін микро- (15-35 нм) және макрофибриллалар (50-150 нм) желісін құрайды (жыртылу беріктігі – $37,12 \pm 0,2$ Мпа; жыртылу кезіндегі салыстырмалы ұзаруы – $3,28 \pm 0,2$ %).

3. Биокөмпозиттік материалдардың үш түрі алынды: БЦ/ BS жасушалары; БЦ/хитозан; БЦ/хитозан/BS экзометаболиттері. Көмпозиттердің құрамына функционалды ингредиенттерді қосу оларды гель пленкасымен немесе БЦ глобулаларымен біріктіру арқылы жүргізілді. Биокөмпозиттерді өндірудің дамыған технологиясы 1 г пленка мен лиофилизацияланған глобулаларда 10^8 өміршең бактерия *B.subtilis* жасушаларын қамтамасыз етеді.

4. *In vitro* жағдайында зерттелетін көмпозиттердің өміршеңдігі анықталды. Құрамында хитозан мен *B. subtilis* метаболиттері бар материалдар ННЗТЗ тышқан фибробласттарының цитологиялық және пролиферативті сипаттамаларына әсер етпеді. Материалдары бар ортада өсірілетін жасушалар МТТ-тесттегі метаболиттік белсенділіктің жоғары деңгейімен (>85%), трипан көкін алып тастау тестіндегі өміршеңдігімен (>90,1%) және ЛДГ-тестінде (>85,2%) сипатталды, бұл цитоуыттылықтың жоқтығын көрсетті, олардың биологиялық үйлесімділігін анықтады.

5. БЦ/BS және БЦ/Х/МBS гель қабықшалары грам теріс бактериялар үшін 24 сағаттан кейін және грам оң бактериялар үшін 10 сағаттан кейін максималды бактерицидтік белсенділікті (бактериялардың 100% өлімі) көрсетті. *B. subtilis* метабиотигі бар хитозанмен күшейтілген БЦ гель пленкалары жара инфекцияларының қоздырғыштарына қатысты ең жоғары антагонистік белсенділікке ие болды: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

6. Зертханалық жануарлардағы эксперименттік шартты таза кесілген жараларды емдеуде алынған материалдарды қолдану репаративті процестерді ынталандырады және сауығу уақытын орта есеппен 24% қысқартады. БЦ Биокөмпозиті/Хитозан/*B. subtilis* экзометаболиттері жара процесінің пайдаланылған моделінде ең жоғары терапиялық тиімділікке ие.

7. Микроорганизм-антагонист BS жасушаларының глобулаларына иммобилизациялау пробиотикалық әрекеттің биокөмпозитін алды, оның 1 г құрамында 10^8 микробқа дейін жасуша бар. Сорбцияланған пробиотик шартты-патогенді микроағзалардың ішектерінен абсолютті азаю және

элиминация кезінде антибиотикоиндуцирленген эксперименттік дисбактериозы бар зертханалық жануарлардың ішектерінің нормофлорасын қалпына келтіреді. BS жасушаларының БЦ матрицасына қосылуы олардың асқазан сөлінің бактерицидтік әсеріне жоғары төзімділігін қамтамасыз етеді.

Осылайша, диссертацияда қойылған барлық міндеттер орындалды.

Негізгі ғылыми жұмыстар жоспарымен байланыс.

Диссертациялық жұмыс 2679/ГФ4 "Трансдермальді терапиялық жүйелерді құру үшін бактериялық целлюлоза негізінде биокомпозициялық материалдарды әзірлеу" жобасы аясында орындалды

Жұмыстың апробациясы.

Диссертациялық жұмыстың материалдары келесі конференцияларда баяндалып, талқыланды:

- "Фараби әлемі" студенттер мен жас ғалымдардың ғылыми конференциясы (14-16 сәуір, 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 Халықаралық Фараби оқулары. Халықарал. ғылыми.-практ. конф. "Биотехнологияның заманауи мәселелері: зертханалық зерттеулерден өндіріске дейін" (Алматы, 2016);

- Халықарал. ғылыми.-практ. конф. "Микробиология мен вирусологияның қазіргі биоиндустрияға қосқан үлесі". Микробиология және вирусология институтының 60 жылдығы. – (Алматы, 2016);

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

- IV Халықаралық Фараби оқулары. Халықарал. ғылыми. "Фараби әлемі" студенттер мен жас ғалымдар конференциясы (10-11 сәуір 2017, Алматы);

- V Халықаралық Фараби оқулары. Халықарал. ғылыми. "Фараби әлемі" студенттер мен жас ғалымдар конференциясы (10-11 сәуір 2018, Алматы);

- X International Symposium "The physics and chemistry of carbon and nanoenergetic materials" (12 Қыркүйек 2018, Almaty);

- XV халықаралық ғылыми-практикалық экологиялық конференция "биосфераның құрылымдық-функционалдық иерархиясындағы биологиялық түр" (8-12 қазан 2018, Белгород, Ресей).

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

- III Халықаралық симпозиумы (27–28 мамыр 2021, Белгород, Ресей);

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

Публикациялар.

Диссертация материалдары бойынша 24 жұмыс, оның ішінде Web of Science немесе Scopus нөлдік емес импакт-факторы бар деректер базасында индекстелетін рецензияланатын шетелдік ғылыми басылымдарда 3 мақала;

Web of Science Core Collection-дағы JCR деректері бойынша 1 квартильге кіретін және Scopus деректер базасында CiteScore бойынша процентиль көрсеткіші кемінде 35 болатын халықаралық рецензияланатын ғылыми журналда 1 мақала; Web of Science Core Collection-дағы JCR деректері бойынша 3 квартильге кіретін халықаралық рецензияланатын ғылыми журналдардағы 2 мақала; ҚР Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті тізбесінен республикалық журналдарда 3 мақала; халықаралық конференция материалдарында 13 тезис; Қазақстан Республикасының 1 патент, 1 патентке өтінім. Мақалаларды құруға үлес эксперименттік зерттеулерді енгізуден, материалды жүйелеу бойынша жұмыстан, алынған нәтижелерді талдаудан және түсіндіруден, сондай -ақ мақалалар мәтінін жазудан тұрады. Авторлардың қатысу пайызы шамамен 50% құрайды.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы.

Диссертациялық жұмыс компьютерлік мәтіннің 117 бетінде баяндалған және мынадай бөлімдерден тұрады: белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиет, зерттеу материалдары мен әдістері, нәтижелері мен оларды талқылау, қорытынды, 243 атаудан тұратын пайдаланылған дереккөздердің тізімі. Жұмысқа 18 кесте, 45 сурет және 2 қосымша кіреді.

Ғылымды дамыту бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі: Табиғи, оның ішінде су ресурстарын ұтымды пайдалану, геология, қайта өңдеу, жаңа материалдар мен технологиялар, қауіпсіз бұйымдар мен конструкциялар.