

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЫЯВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ БИОКОМПОЗИТОВ,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОЛИ-ГАММА-ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ,
ПРОДУЦИРУЕМОЙ ГАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА
BACILLUS**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Тазаткиной Ирины Михайловны

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук _____ С.А. Коннова

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук _____ С.А. Коннова

Саратов 2026

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время полимерные гели привлекают значительное внимание исследователей и находят широкое применение в различных областях, благодаря своим уникальным механическим, физико-химическим и биосовместимым свойствам. Полимерный гель — это трехмерная сеть полимеров, которая может удерживать значительное количество жидкости, что придает ему гелеобразную консистенцию. Полимерные гели обладают уникальными свойствами, такими как высокая вязкость, эластичность и способность к изменению формы под воздействием внешних факторов (температуры, pH и т.д.) [1, 2].

Гидрогели - это водонасыщенные трёхмерные сети полимеров, а поли- γ -глутаминовая кислота (γ -ПГК), благодаря своей гидрофильности, широко используется для их создания. Поли- γ -глутаминовая кислота — это природный, биоразлагаемый биополимер, построенный из звеньев глутаминовой кислоты, соединённых особыми γ -амидными связями, что отличает её от белков, использующих α -амидные связи. γ -ПГК может быть гомополимером L- или D-глутаминовой кислоты, или же представлять собой случайный сополимер обоих изомеров, что прямо влияет на её свойства и потенциальные применения. Благодаря водорастворимости, съедобности и экологической безопасности, она привлекательна для пищевой индустрии, косметики, медицины, фармакологии, сферы очистки сточных вод и пр. [3].

Цель работы: получение и оценка некоторых свойств гелей, полученных с поли-гамма-глутаминовой кислотой, продуцируемой галофильными бактериями рода *Bacillus*

Задачи:

- 1) обобщение данных литературы о продуцентах, структурных особенностях, функциях и практическом использовании γ -ПГК;
- 2) очистка препарата γ -ПГК от спор;
- 3) освоение методик и изготовление нескольких вариантов биоконкомпозитов с добавлением γ -ПГК;

4) сравнение полученных биоконпозитов по устойчивости к замораживанию, лиофилизации, набуханию в разных средах.

Материалы исследования. Работу проводили на базе кафедры биохимии и биофизики биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского в период с 2024 по 2026 г. В качестве объекта исследования был использован любезно предоставленный сотрудниками лаборатории биохимии ИБФРМ РАН лиофилизированный препарат γ -ПГК-2, продуцируемый культурой галотолерантных бактерий *Bacillus atrapheus* B221, изолированной из пелоида озера Боткуль (Волгоградская область, Россия). Молекулярная масса γ -ПГК составила $4,064 \cdot 10^6$ Да.

Структура работы. Диплом изложен на 49 страницах и содержит следующие структурные элементы: Содержание, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

Характеристика и классификация гелей

γ -ПГК как перспективный компонент для создания гидрогелей с разнообразными характеристиками, в которой было рассмотрено строение γ -ПГК, ее продуценты, зависимость продукции γ -ПГК от L-глутаминовой кислоты штаммами, пути биосинтеза γ -ПГК, методы очистки γ -ПГК от спор бактерий, свойства γ -ПГК в гелях и методы создания гелей на основе γ -ПГК

Материалы и методы исследований, в которой рассматривались материалы исследования и методы его проведения.

Был проведен анализ контаминации и очистка препаратов γ -ПГК от спор, а также были проанализированы испробованные методики получения гелей и изучены свойства некоторых полученных биоконпозитов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы очистки препарата γ -ПГК-2 от спор. Было опробовано несколько методик очистки препарата от спор: метод очистки препарата γ -ПГК-2 от спор обработкой в СВЧ –печи, метод очистки препарата γ -ПГК-2 от спор поверхностно-активным веществом при кипячении, метод очистки раствора гамма-полиглутаминовой кислоты от спор фильтрацией с использованием мембранного фильтра. После очистки определяли кинематическую вязкость раствора γ -ПГК по формуле (1), на основе среднего времени истечения, полученного из 6-10 повторных измерений:

$$V = \frac{g}{9,807} \times K \times T ,$$

(1)

где V - кинематическая вязкость жидкости, $\text{мм}^2/\text{с}$,

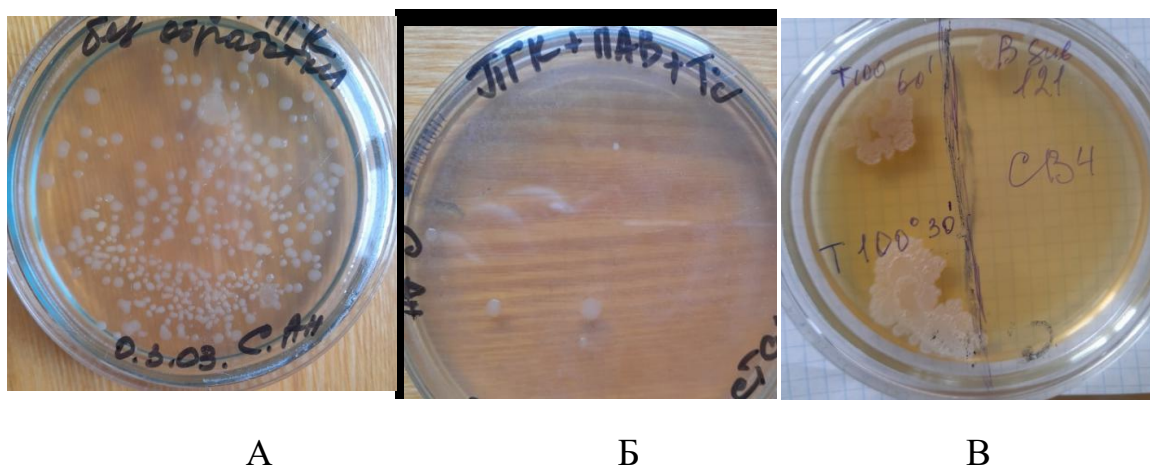
K - постоянная вискозиметра, $\text{мм}^2/\text{с}^2$,

T - время истечения жидкости, с ,

g - ускорение свободного падения в месте измерений, $\text{м}/\text{с}^2$ [4].

Высев раствора γ -ПГК-2 (0,4 мг/мл) на богатую агаризованную питательную среду выявил контаминацию его бактериальными спорами (Рисунок 1А). Основываясь на данных литературы использовали несколько способов инактивации спор в растворах γ -ПГК-2. Использование кипячения раствора в течение 30 или 60 минут не приводило к его стерилизации (Рисунок 1В). Дополнение к режиму прогревания воздействия поверхностно-активного вещества (ПАВ) – цетил-3-метил аммоний бромида с концентрацией 0,5 мг/мл, так же не приводило к стерильности препарата, хотя и снижало концентрацию жизнеспособных спор на мл раствора (Рисунок 1Б). Использование для прогревания СВЧ излучения в течение в течение 4-х минут убивало споры в препарате (Рисунок 1В). Достигался эффект удаления из раствора спор и за счет фильтрации через мембранный фильтр Sterile Syringe Filters PVDF Membrane 0,45 μm (Merk, Германия).

Однако, способ стерилизации СВЧ излучением оказался неприемлемым для наших исследований, так как значительно (в три раза) снижал кинематическую вязкость растворов биополимеров – важный параметр для формирования гидрогелей (Таблица 1). Кинематическую вязкость растворов γ -ПГК-2 определяли с использованием капиллярного вискозиметра ВПЖ-2.



А – высев из исходного препарата; Б – высев после воздействия термообработки в присутствии ПАВ; В – высев по результатам термической обработки при 100°C в течение 30 и 60 мин (слева) и обработке СВЧ в течение 4 мин (справа)

Рисунок 1 – Результаты исследования жизнеспособности спор в исходном препарате γ -ПГК-2 и при различных воздействиях.

Высокая кинематическая вязкость γ -ПГК-2 необходима для последующего приготовления геля, так как обеспечивает формирование стабильной гелевой структуры. Ее снижение может повлиять на физические свойства конечного продукта.

Таблица 1 – Кинематическая вязкость растворов γ -ПГК-2 при различных способах успешной стерилизации

Препарат γ -ПГК-2 (способ стерилизации)	Кинематическая вязкость раствора γ -ПГК-2, ($M \pm m$) мм ² /с
Фильтрация	18,57±0,52
Обработка СВЧ	5,98± 0,02

При фильтрации γ -ПГК-2 через бактериальный фильтр образец был очищен от спор без потери важных свойств полученного продукта, а именно без существенного снижения вязкости. Но метод ручной и трудоемкий, что делает его менее эффективным при масштабных или серийных обработках и повышает себестоимость процедуры. Также фильтры склонны к быстрому засорению, из-за чего их приходится менять несколько раз в ходе одной очистки, что повышает расход материалов и делает процедуру более затратной.

Получение гелей с поли- γ -глутаминовой кислотой. Было опробовано несколько методик по приготовлению гелей с γ -ПГК-2: на основе желатина и γ -ПГК-2 [5], на основе желатина и γ -ПГК-2, модифицированный глутаровым альдегидом [6, 7] и на основе хитозана, альгината и γ -ПГК [8]. После получения были исследованы некоторые их свойства: устойчивость к замораживанию и оттаиванию, к лиофилизации и способность к набуханию.

Несмотря на строгое следование опубликованным методикам получение гелеобразных структур не гарантировано, так как вносимый препарат γ -ПГК в зависимости от производителя может обладать свойствами, содействующими или мешающими этому процессу.

В ходе эксперимента не наблюдалось гелеобразования в системе модифицированный желатин– γ -ПГК-2. Образование геля желатина связано с формированием тройных спиральных структур при охлаждении, что, возможно, не произошло при охлаждении в ходе подготовки к лиофилизации, даже несмотря на то, что образец γ -ПГК-2 был высокомолекулярным и должен был обладать высокой вязкостью в геле. Также процесс лиофилизации мог привести к частичной деструкции системы и снижению способности к повторному гелеобразованию.

Гель с желатином, модифицированный глутаровым альдегидом и γ -ПГК-2, также не показал устойчивости, что может быть связано с несколькими причинами. При щелочном значении pH электростатическое отталкивание между молекулами желатина значительно возрастает, а

глутаровый альдегид содержит две альдегидные группы, которые в этом случае реагируют с аминогруппами желатина с образованием химических связей. Возможно на этом этапе степень сшивки была недостаточной для образования геля. Так как полимеры в системе вели себя не так, как описано в литературе, кукурузное масло введенное в гель в соответствии с исходной методикой не сформировало единого продукта с другими компонентами.

Попытки создания гелей на основе хитозана, альгината и γ -ПГК-2 были более успешными, в результате получены 3 типа гидрогелей: 1 - хитозан-альгинат рН 6 (АХ); 2 - хитозан-альгинат- γ -ПГК без контроля рН при синтезе (АХПГК); 3 - хитозан-альгинат- γ -ПГК с контролем рН6 при синтезе (АХПГКрН). Величина рН оказывала влияние на процесс гелеобразования за счёт изменения растворимости и степени ионизации хитозана. При рН 5 гелеобразование не происходило, тогда как при повышении рН до 6 гель формировался: при рН 6 создавались более благоприятные условия для взаимодействия хитозана с альгинатом и с γ -ПГК-2 и формирования пространственной гелевой сети. В качестве контроля готовили гель АХ без γ -ПГК-2. По результатам приготовления гелей на основе альгината, хитозана и γ -ПГК была выполнена лиофилизация гелей (Рисунок 2) с использованием лиофильной сушки Benchtop 2K (VirTis, США).



1 - хитозан-альгинат рН 6 (АХ);

2 - хитозан-альгинат- γ -ПГК без контроля рН при синтезе (АХПГК);

3 - хитозан-альгинат- γ -ПГК с контролем рН6 при синтезе (АХПГКрН).

Рисунок 2 — Внешний вид полученных гидрогелей до лиофилизации

Изучение свойств полученных гелей. Гели АХ, АХПГК и АХПГКрН продемонстрировали устойчивость к замораживанию и оттаиванию, и процедуре лиофилизации, которая предусматривает глубокое замораживание водного раствора вещества в жидком азоте с последующим переходом воды из твердого состояния в газообразное, минуя жидкую фазу. Гели проявили устойчивость к многократной лиофилизации и восстанавливали исходный объем после добавления жидкости. Это свойство гелей является чрезвычайно важным для биотехнологии, и связано это с увеличением сроков хранения, транспортировки и эксплуатации гелей. Подобного рода гели могут быть востребованы для пищевой промышленности или в медицине. Максимальный коэффициент набухания (КН) для гелей в воде достигался спустя 20 минут, а в фосфатном буфере и в физиологическом растворе - спустя 10 минут. Результаты исследования коэффициента набухания (КН) лиофилизированных гелей в различных жидкостях представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Коэффициенты набухания (КН) лиофилизированных препаратов гелей в различных жидкостях

Типы гелей	Используемые жидкости		
	Вода	Фосфатный буфер	Физиологический раствор
	КН гелей		
АХ	25,17±6,60	15,89±1,18	15,54±2,23
АХПГК	14,3±8,98	11,44±1,15*	9,39±0,91*
АХПГКрН	18,8 ±4,04	15,93±3,85	11,31±0,33*

Примечание: * достоверные отличия показателя от контрольного геля АХ.

Метод определения КН является общепринятым для оценки влагоудерживающей способности гелей, но при этом является полуколичественным. Для гелей с добавлением γ -ПГК-2 не выявлено достоверных различий КН при набухании в воде. При набухании

лиофилизированных гелей в фосфатном буфере отмечено достоверное понижение влагоудерживающей способности на 32 % по сравнению с гелем АХ (без γ -ПГК-2) и с гелем АХПГКрН. При набухании в физиологическом растворе имеет место достоверное понижение величины КН АХПГКрН и АХПГК на 30 и 40 % соответственно относительно КН контрольного геля.

Для АХПГК понижение влагоудерживающих свойств, вероятно, связано с уменьшением количества свободных карбоксильных групп (COO^-) за счет увеличения количества связей с аминогруппами (NH_3^+) хитозана. Таким образом добавление к гелю АХ γ -ПГК-2 приводило к повышению стабильности биополимера в физиологических условиях, но снижению влагоудерживающей способности.

По результатам проведенных экспериментов можно констатировать, что изолированные с высоким выходом препарат γ -ПГК-2 перспективен для дальнейших исследований ее влияния на стабилизацию биоразлагаемых гидрогелей на основе природных материалов.

Биокомпозит на основе хитозан-альгинат- γ -ПГК с контролем рН6 при синтезе формировался за счет образования комплекса с полиэлектролитами: хитозан служил поликатионным каркасом, а альгинат и γ -ПГК-2 выступили в роли биосовместимых полианионов. При рН6 возрастает количество свободных карбоксильных групп (COO^-) альгината и γ -ПГК-2, способных вступать в электростатическое взаимодействие с протонированными аминогруппами хитозана (NH_3^+), отчего формировался стабильный биокомпозит. Однако, это повлияло на набухание геля увеличение числа межмолекулярных электростатических взаимодействий приводит к повышению плотности сшивки гидрогеля, уменьшению подвижности полимерных цепей и снижению количества свободных гидрофильных групп, доступных для связывания воды, отчего КН у АХПГКрН хуже, чем у контроля АХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день актуально изучение полимерных гелей и биокompозитов, так как они широко применяются в различных сферах благодаря своим свойствам. И нередко γ -ПГК является одним из их компонентов из-за своей биоразлагаемости, растворимости в воде и наличия загущающих и впитывающих свойств.

В ходе работы были исследованы и опробованы различные методы очистки раствора гамма-полиглутаминовой кислоты от спор бактерий и выявлен наиболее подходящий – фильтрация через фильтр, благодаря которому γ -ПГК не теряла одно из важных своих свойств для дальнейшего получения биокompозита – вязкости.

В результате изучения и опробирования нескольких методик был получен гель на основе альгината, хитозана и γ -ПГК и были изучены некоторые его свойства.

Итоги данного исследования имеют практическую ценность в первую очередь для пищевой промышленности и медицины.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1 На основе сравнительных исследований ряда методов стерилизации раствора препарата γ -ПГК-2 от спор продуцента — галотолерантных бактерий *Bacillus atrapheus* B221, показано, что оптимальной обработкой является фильтрация через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Преимущество этого способа стерилизации препарата перед нагреванием, обработкой детергентами или СВЧ излучением состоит в сохранении нативных свойств γ -ПГК-2, как показали исследования кинематической вязкости ее стерильного раствора.

2 Опробовано несколько методик изготовления биокompозитов с добавлением γ -ПГК: на основе желатина и γ -ПГК, и на основе хитозана, альгината и γ -ПГК при варьировании соотношений компонентов, pH, и

использовании модифицирующих агентов. Созданы два типа биокompозитов, сохраняющих способность к восстановлению объема геля после нескольких лиофилизаций и глубокого замораживания.

3. Сравнительный анализ гелей с добавлением γ -ПГК показал, что максимальный коэффициент набухания (КН) для гелей в воде достигался спустя 20 минут, а в фосфатном буфере и в физиологическом растворе - спустя 10 минут. Отмечено достоверное понижение влагоудерживающей способности на 32 % по сравнению с гелем АХ (без γ -ПГК-2) и с гелем АХПГКрН, но увеличение устойчивости к лиофилизации. По результатам проведенных экспериментов можно констатировать, что препарат γ -ПГК-2 перспективен для дальнейших исследований ее влияния на стабилизацию биоразлагаемых гидрогелей на основе природных материалов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Филиппова, О. Е. Responsive polymer gels / О. Е. Филиппова // Высокополимерные соединения. Серия С. – 2000. – Т. 42, № 12. – С. 2328–2352.
- 2 Роговина, Л. З. К определению понятия «полимерный гель» / Л. З. Роговина, В. Г. Васильев, Е. Е. Браудо // Высокомолекулярные соединения. Серия С. – 2008. – Т. 50, № 7. – С. 1397–1406.
- 3 Wang, L. Poly- γ -glutamic acid: Recent achievements, diverse applications and future perspectives / L. Wang, S. Chen, B. Yu // Trends in food science & technology. – 2022. – Vol. 119. – P. 1–12.
- 4 Паспорт капиллярного вискозиметра ВПЖ-2. – Санкт-Петербург: Издательство "ЭКРОС", 2015. – 4 с
- 5 Improving gelling properties of fish gelatin by γ -polyglutamic acid with four different molecular weights / Shu S. [et al.] // International journal of food science and technology. – 2023. – Vol. 58, N 12. – P. 6588–6597
- 6 Effect of preparation factors and storage temperature on fish oil-loaded crosslinked gelatin nanoparticle pickering emulsions in liquid forms. / Ding M. [et al.] // Food Hydrocolloids – 2019. – Vol. 95. – P. 326–335
- 7 Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. / Azarmi S. [et al.] // Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the canadian society for pharmaceutical sciences, societe canadienne des sciences pharmaceutiques. – 2006. – Vol. 9. N 1. – P. 124–132
- 8 Preparation of the chitosan/poly(glutamic acid)/alginate polyelectrolyte complexing hydrogel and study on its drug releasing property / Chen Y. [et al.] // Carbohydrate polymers – 2018. – Vol. 191. – P. 8–16