



УДК 544.4:615.31

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.04.078>

Т. В. Крупская

Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев

E-mail: krupska@ukr.net

Свойства композитной системы на основе высокодисперсного кремнезема и рифампицина

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В. В. Туровым)

Методами ИК и УФ спектроскопии исследовано взаимодействие частиц нанокремнезема с антибиотиком рифампицином (Rif) в широком диапазоне его концентраций. Показано, что оптимальное покрытие поверхности кремнезема достигается при концентрации Rif 0,4 ммоль/г. Обнаружено стимулирующее действие композита SiO₂-Rif на суспензию хлебопекарских дрожжей, что делает его перспективным для применения в биотехнологических циклах с использованием процесса брожения с целью предотвращения загрязнения дрожжей посторонними микроорганизмами.

Ключевые слова: нанокремнезем, импрегнирование, рифампицин, композитная система, дрожжевые клетки.

Дрожжевые клетки являются одним из наиболее распространенных микроорганизмов [1, 2]. Их споры присутствуют в воздухе и легко попадают в пищевые продукты, вызывая процессы брожения. В пищевой промышленности дрожжи используют во многих технологических процессах, таких как выпечка хлеба, производство спирта и спиртных напитков, некоторых видов заквасок и т. д. [3, 4]. Однако дрожжевые клетки, в свою очередь, могут быть подвержены бактериальным загрязнениям, которые влияют на технологические процессы и вкусовые качества продукции, производимой в биотехнологических циклах [4, 5]. Поэтому практически важной задачей является создание антибактериальных препаратов, которые слабо влияют на дрожжевые клетки.

Одним из перспективных направлений в создании подобных препаратов является иммобилизация на поверхности минерального носителя с высокоразвитой поверхностью (нанокремнезема) небольших количеств антибиотика, слабо влияющего на дрожжевые кле-

тки. При этом, как показывают предыдущие исследования, кремнезем способен стимулировать размножение дрожжевых клеток, в то время как эффективность антибиотика в иммобилизованном состоянии существенно превышает действие чистого антибиотика, что обусловлено возможностью формирования в зоне контакта кластеризованных форм воды, обеспечивающих быстрое проникновение адсорбированных веществ в ткани организма [6, 7].

Рифампицин (Rif) — полусинтетический антибиотик рифамицинового ряда с широким спектром антимикробного действия, слабо влияющий на грибковые клетки, к которым относятся дрожжи [8]. При низких концентрациях Rif имеет бактерицидные свойства относительно микобактерий туберкулеза, а также действует на грамположительные и грамотрицательные кокки (стафило-, стрепто-, пневмо-, энтеро-, менинго- и гонококки), в более высоких концентрациях он активен относительно грамотрицательных бактерий [8–10]. Механизм действия антибиотиков рифампицинового ряда связан с его способностью угнетать синтез нуклеиновых кислот бактерий. Большая часть этих антибиотиков способна блокировать синтез ДНК и в клетках эукариотов, поэтому они используются в качестве противоопухолевых препаратов [8, 9].

Целью работы было создание нанокompозитной системы на основе высокодисперсного кремнезема и Rif, которая не угнетает развитие дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, изучение механизма связывания молекул антибиотика с поверхностью; исследование его десорбции в водную среду и физиологический раствор.

Материалы и методы исследования. В качестве носителя для закрепления Rif использовали синтетический аморфный высокодисперсный кремнезем (ВДК) (аэросил марки А-300 с удельной поверхностью 285 м²/г производства Калушского экспериментального завода Института химии поверхности НАН Украины), который характеризуется размерами первичных частичек в диапазоне от 5 до 40 нм, между которыми существуют сильные взаимодействия, в результате чего на практике имеют дело с агрегатами и агломератами размером 100–1000 нм.

Rif представляет собой гетероциклическое высокомолекулярное соединение (C₄₃H₅₈N₄O₁₂). Молекула Rif имеет разные функциональные группы, которые проявляют кислотные свойства и вступают в сложные взаимодействия друг с другом [10]. Rif плохо растворим в воде, что можно объяснить наличием в составе молекулы иминогруппы (основание Шиффа), поэтому он используется в виде растворимой натриевой соли [8–10].

Адсорбционное закрепление Rif на поверхности ВДК проводили методом импрегнирования. Для этого навеску Rif растворяли в 100 мл 96%-го этилового спирта. Затем к 3 г ВДК прибавляли спиртовые растворы антибиотика и тщательно перемешивали, после чего уравнивали при комнатной температуре в течение 24 ч, удаляли спирт медленным нагреванием (60 °С, 3 ч). В результате получено пять образцов композита SiO₂-Rif с содержанием органического вещества в диапазоне 0,01–0,4 ммоль/г. Десорбцию Rif проводили в разные среды: для этого навеску образца 0,1 г, с концентрацией антибиотика 0,2 и 0,4 ммоль/г, заливали 100 мл десорбирующего раствора (вода, физиологический раствор, 96%-й этиловый спирт). Спектры электронного поглощения растворов образцов кремнезема, импрегнированного Rif, записывали на спектрофотометре Specord M-40 (“Karl Zeiss”, Германия).

ИК спектры полученного биокомпозита регистрировали на однолучевом ИК фурье-спектрометре Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Германия). Для этого приготовленные образцы смешивали со свежепрокаленным KBr при соотношении компонентов 1 : 5.

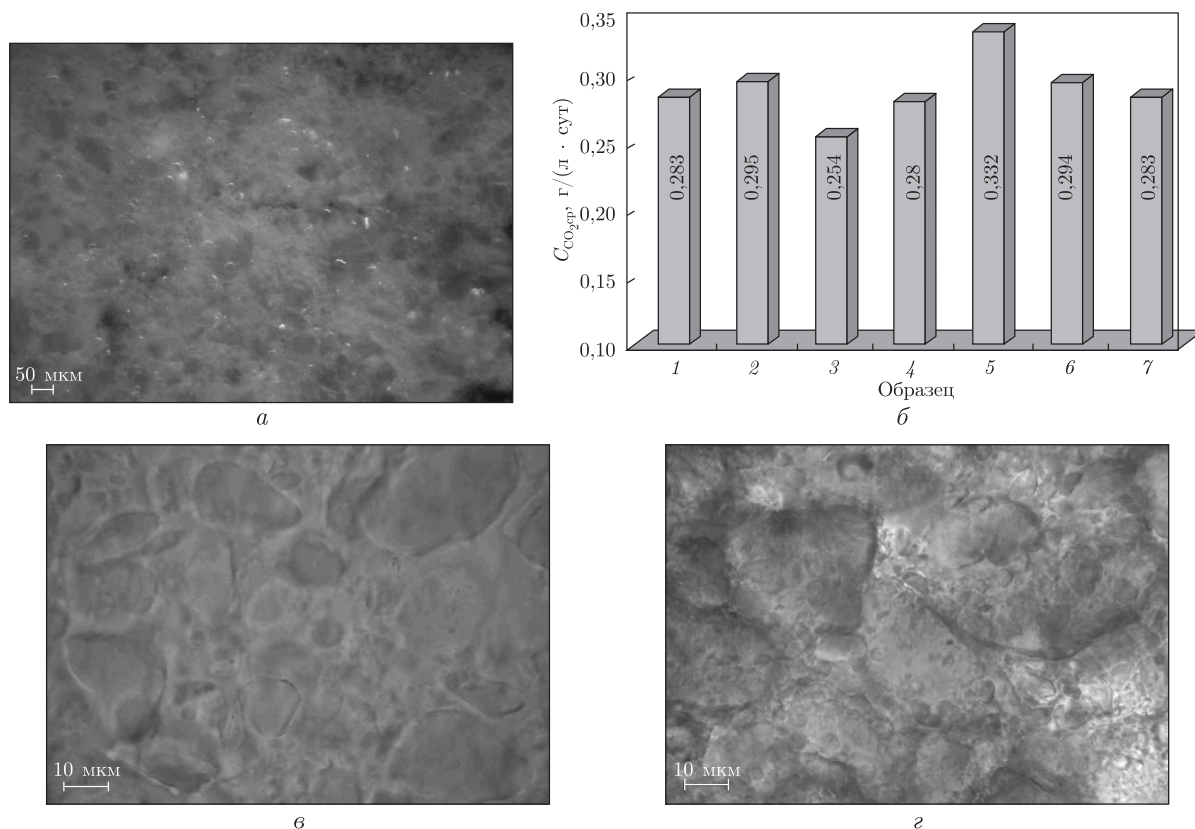


Рис. 1. Микрофотографии кремнезема, модифицированного Rif, в отраженном свете при увеличении $\times 100$: 0,2 ммоль/г (а); 0,4 ммоль/г (б); в режиме пропускания при увеличении $\times 1000$: 0,2 ммоль/г (в); 0,4 ммоль/г (г) в присутствии спирта

Микрофотографии частиц $\text{SiO}_2\text{-Rif}$ получены с помощью микроскопа Primo Star (“Carl Zeiss”, Германия) при увеличении $\times 100$, $\times 400$ и $\times 1000$ с использованием иммерсии.

Результаты исследований и их обсуждение. Изучение полученных образцов, содержащих разную концентрацию Rif (0,2 и 0,4 ммоль/г) (рис. 1), показало, что строение частиц слабо зависит от концентрации импрегнирующей фазы. Частицы композита имеют неправильную форму и широкое распределение по размерам. Они представляют собой крупные агрегаты, которые состоят из агрегатов и первичных частиц, что является характерным для нанокремнезёмов. При импрегнировании Rif поверхности кремнезема, благодаря желтой окраске, антибиотик и кремнезём хорошо различимы в режиме отражения (см. рис. 1, а, б).

В поле зрения микроскопа наблюдаются агрегаты нанокремнезема разных размеров и некоторое количество мелких кристаллов Rif. Видно, что препарат практически равномерно распределяется по поверхности кремнезема (см. рис. 1, б), что подтверждается также и фотографиями, полученными в режиме пропускания (см. рис. 1, в, г). В присутствии небольшого количества спирта происходит частичное растворение Rif и наблюдаются “пожелтевшие агрегаты” нанокремнезема разных размеров от 1 до 100 мкм (см. рис. 1, в, г).

Взаимодействие адсорбированного на поверхности кремнезема Rif с подложкой изучали по изменениям ИК спектральных характеристик SiOH-групп ВДК при варьировании поверхностной концентрации антибиотика (C_{Rif}) в пределах 0,01–0,4 ммоль/г (см. рис. 2, а).

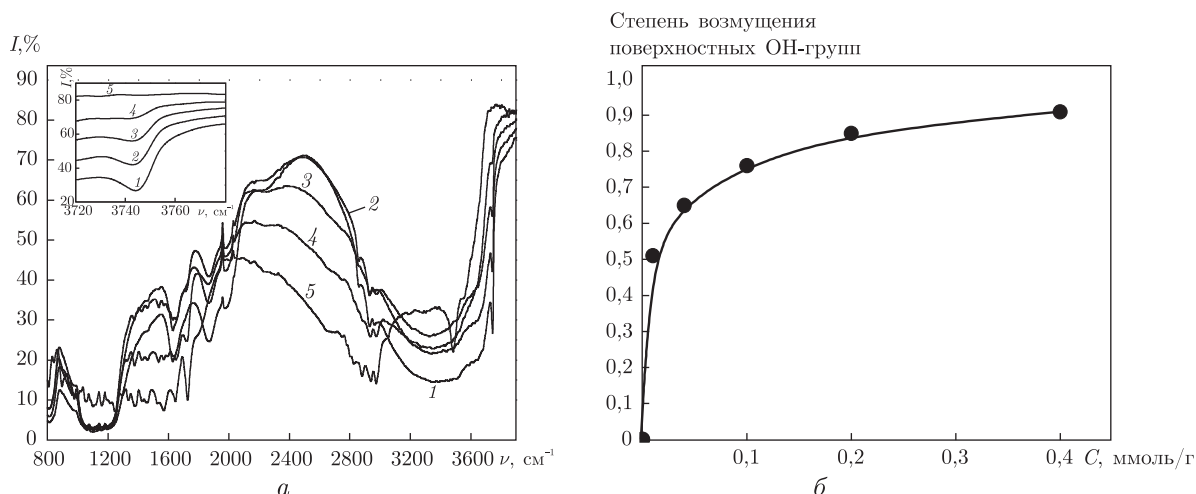


Рис. 2. ИК спектры композитов $\text{SiO}_2\text{-Rif}$ и их составляющих (*a*: 1 — SiO_2 ; композиты $\text{SiO}_2\text{-Rif}$: 2 — 0,01, 3 — 0,1, 4 — 0,4 ммоль/л Rif; 5 — чистый Rif); изменение степени возмущения поверхностных OH-групп ВДК ($\nu = 3748 \text{ cm}^{-1}$) в зависимости от количества Rif на поверхности SiO_2 (*б*)

В спектрах могут быть идентифицированы полосы валентных и деформационных колебаний Rif и валентных колебаний свободных (не участвующих в образовании водородных связей) силанольных групп (3748 cm^{-1}). При увеличении C_{Rif} интенсивность полосы свободных силанольных групп уменьшается, что обусловлено образованием водородных связей между электронодонорными группами антибиотика и протонами гидроксильных групп кремнезема (см. рис. 2, *a*). В композитах присутствуют все полосы, характерные для Rif: симметричные (2856 cm^{-1}) и асимметричные (2826 cm^{-1}) валентные колебания ($\nu_{\text{C-H}}$). В случае $\text{SiO}_2\text{-Rif}$ они могут быть видны как слабоинтенсивный сигнал, расположенный на левом плече полосы поглощения гидроксильных групп связанной воды, кремнезема и Rif, участвующих в формировании водородных связей. Для композита $\text{SiO}_2\text{-Rif}$ необходимо также отметить наличие полос деформационных колебаний, характерных для CH_3 -групп (1375 cm^{-1}), которые менее интенсивны, чем в чистом антибиотике.

Пик поглощения в области между 1525 и 1730 cm^{-1} относится к валентным колебаниям связи C=O в амидной группе NH-C=O ($1630\text{--}1670 \text{ cm}^{-1}$, амид I). В области 1554 cm^{-1} проявляются деформационные колебания типа амид II, являющиеся комбинацией валентных колебаний связи C-N и деформационных колебаний связи N-H . В целом наблюдаемая спектральная картина характерна для систем адсорбат/нанокремнезем при равномерном распределении адсорбата в адсорбционном слое. Характеристические полосы антибиотика присутствуют также в областях поглощения 1281 и 1040 cm^{-1} ацетильных групп $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, которые при исследовании полученного композита, перекрываются полосой поглощения кремнезема. В композитной системе наблюдается смещение полос при $1721, 1656 \text{ cm}^{-1}$. Это может быть вызвано формированием водородных связей, диполь-дипольных комплексов или вандерваальсовыми взаимодействиями.

Рассчитанная на основании ИК спектральных данных зависимость степени возмущения свободных силанольных групп от концентрации Rif приведена на рис. 2, *б*. С увеличением C_{Rif} степень возмущения OH-групп кремнезема возрастает и достигает максимального значения (0,91) при $C_{\text{Rif}} = 0,4$ ммоль/г. Можно ожидать, что дальнейшее повышение концентрации приведет лишь к незначительному увеличению степени замещения свободных

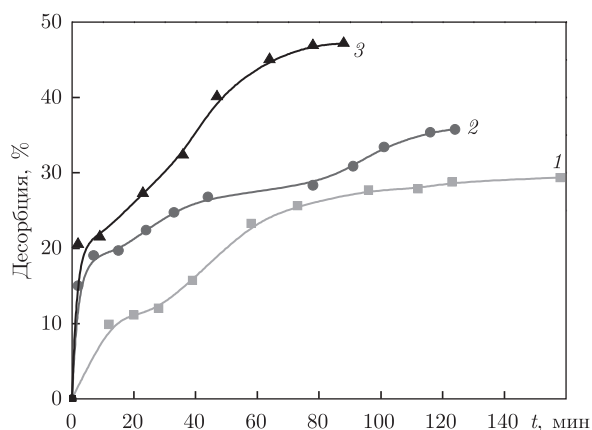


Рис. 3. Десорбция Rif ($C_{\text{Rif}} = 0,2$ ммоль/л) с поверхности кремнезема в разные среды: 1 — воду; 2 — физиологический раствор; 3 — спирт

силанольных групп. Возможно, это обусловлено образованием такого сорбционного слоя, в котором часть гидроксильных групп практически недоступна для образования водородных связей с органическими молекулами.

В структуре антибиотика присутствует сложная система π , π - и p , π -сопряжения, которая включает нафталиновое ядро, иминогруппу, амидную группу, систему кратных связей и ряд доноров и акцепторов электронов, а также фенольные гидроксилы. Кроме того, в молекуле присутствует пиперазильный радикал и сложноэфирная группа [8, 9]. В УФ/ВИЗ-спектрах антибиотика присутствует несколько интенсивных полос с максимумами 237, 255, 334, 475 нм. Полоса в видимой области спектра, которая обуславливает окраску раствора, относится к $n \rightarrow \pi$ -переходу и соответствует переносу неподеленной электронной пары атомов кислорода карбонильных групп на вакантную орбиталь π -электронов сопряженной электронной системы. Полоса при 475 нм соответствует $\pi \rightarrow \pi^*$ -переносу электрона между электронодонорной группой (CO^-) и заместителем (ОН) нафтогидрохинонового хромофора [11–13].

Для оценки стабильности полученных нанокомпозитов, исследовали скорость высвобождения Rif, адсорбированного на поверхности кремнезема. Определяли его десорбцию с образцов, в которых концентрация антибиотика составляла 0,2 и 0,4 ммоль/г, в разные типы жидких сред: воду, физиологический раствор, 96%-й этиловый спирт (рис. 3). Концентрацию Rif в анализируемых растворах рассчитывали по интенсивности полосы при 475 нм. Десорбцию изучали в условиях, которые моделировали статическую десорбцию: 0,1 г композита с определенной концентрацией Rif заливали 100 мл воды (физиологического раствора или спирта) и через определенные промежутки времени отбирали пробы по 3,0 мл, центрифугировали и определяли равновесную концентрацию антибиотика. Оказалось, что на кинетических кривых содержатся два участка, отвечающих разным кинетическим параметрам процесса десорбции. С увеличением поверхностной концентрации антибиотика возрастает доля легко высвобождающегося Rif. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что десорбция антибиотика (почти 50%) с поверхности кремнезема в физиологический раствор происходит почти за 3 ч, тогда как в воду и спирт за 5 ч его десорбируется 25 и 35% соответственно. Таким образом, при переходе от порошка Rif к Rif, адсорбционно закрепленному на поверхности кремнезема, в биологических средах наблюдается значи-

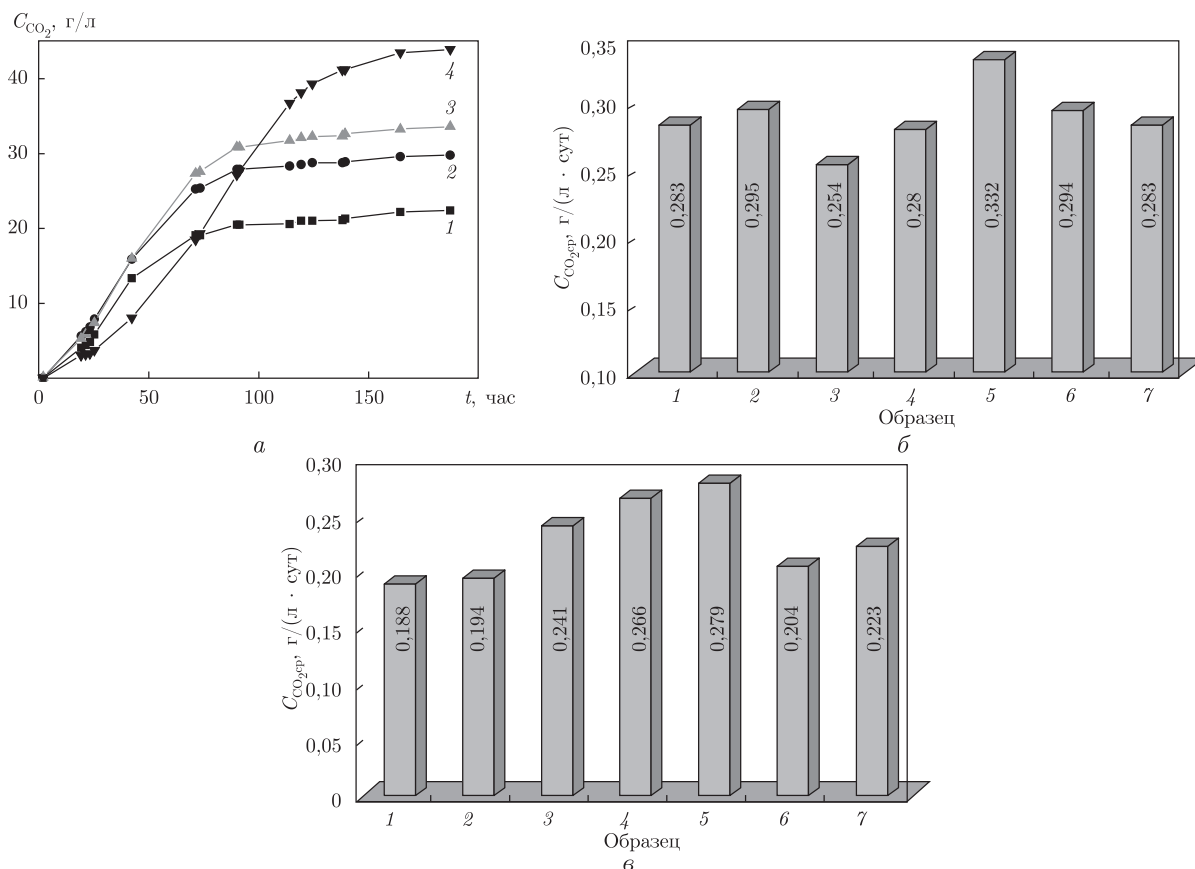


Рис. 4. Выделение углекислого газа суспензией клеток хлебопекарских дрожжей при действии Rif, кремнезема и композита SiO₂-Rif (а): 1 — контроль; 2 — 0,4 ммоль/г Rif; 3 — чистый Rif; 4 — ВДК; диаграмма выделения среднего количества углекислого газа суспензией клеток хлебопекарских дрожжей за 42 ч (б) и 137 ч (в): 1 — контроль; композиты SiO₂-Rif: 2 — 0,01, 3 — 0,02, 4 — 0,1, 5 — 0,2, 6 — 0,4 ммоль/г Rif; 7 — чистый Rif

тельный пролонгирующий эффект.

Исследовано влияние кремнезема, Rif и полученных композитных систем на суспензию клеток хлебопекарских дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 4). Результаты эксперимента показали, что действие антибиотика на суспензию клеток носит сложный характер.

Из рис. 4, а видно, что в начале опыта в присутствии антибиотика происходит активация выделения углекислого газа, по сравнению с уровнем газовыделения под влиянием кремнезема. Угнетение жизнедеятельности клеток дрожжей Rif не отмечается в течение длительного промежутка времени. Даже по сравнению с контролем газовыделение суспензией клеток *S. cerevisiae* в присутствии чистого кремнезема происходит интенсивнее, а для композита SiO₂-Rif — еще повышается (см. рис. 4, а). В течение первых 42 ч выращивания клеток наиболее активное выделение углекислого газа имеет место для Rif, закрепленного на поверхности кремнезема, при $C_{Rif} = 0,4$ ммоль/г. Зарегистрировано увеличение активности клеток при выращивании суспензии клеток дрожжей в течение 137 ч в присутствии как композитной системы SiO₂-Rif, так и ее составляющих.

Таким образом, установлено, что частицы нанокompозита, полученного путем импрегнирования Rif частиц ВДК, имеют размер, близкий к размеру частиц исходного кремне-

зема. Оптимальное покрытие поверхности кремнезема достигается при концентрации Rif 0,4 ммоль/г. В процессе импрегнирования антибиотик взаимодействует с поверхностью кремнезема путем образования водородных связей с силанольными группами. Наибольшая степень замещения свободных силанольных групп составляет 0,91. Органическая составляющая композита десорбируется с поверхности за относительно большой промежуток времени, ввиду чего он может успешно применяться в качестве сорбента пролонгированного действия. Благодаря стимулирующему действию на суспензию хлебопекарских дрожжей композит SiO₂-Rif является перспективным для применения в биотехнологических циклах с использованием процесса брожения с целью предотвращения загрязнения дрожжей посторонними микроорганизмами.

Цитированная литература

1. Бабьева И. П., Чернов И. Ю. Биология дрожжей. – Москва: Т-во науч. изд. КМК, 2004. – 221 с.
2. Магомедова Е. С., Абдуллабекова Д. А., Абрамов Ш. А. Разнообразие и морфофизиологические свойства дрожжей, обитающих в условиях различной вертикальной поясности // Экология микроорганизмов. – 2009. – № 1. – С. 99–102.
3. Илюшкина Л. Н. Дрожжевые грибы и продукты их жизнедеятельности. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2010. – 48 с.
4. Промышленная микробиология/ Под ред. Н. С. Егорова. – Москва: Высш. шк., 1989. – 688 с.
5. Бурьян Н. И., Тюрин Л. В. Микробиология виноделия. – Москва: Пищ. пром-ть, 1979. – 280 с.
6. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A. Unusual Properties of Water at Hydrophilic / Hydrophobic Interfaces // Adv. Colloid Interface Sci. – 2005. – **118**. – P. 125–172.
7. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. – New York: Taylor&Francis, 2013. – 1076 p.
8. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, Наука, 2004. – 528 с.
9. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия. – Москва: Медицина, 1982. – 496 с.
10. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – Москва: Новая волна, 2012. – 1216 с.
11. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. – Ленинград: Наука, 1967. – 614 с.
12. Howes B. D., Guerrini L., Sanchez-Cortes S., Marzocchi M. P., Garcia-Ramos J. V., Smulevich G. The influence of pH and anions on the adsorption mechanism of rifampicin on silver colloids // J. Raman Spectrosc. – 2007. – **38**. – P. 859–864.
13. Бичер Э., Ёздемир С. Вольтамперометрическое и спектроскопическое исследование взаимодействия противоракового лекарства из трав – рутин с противотуберкулезным средством рифампицином // Электрохимия. – 2010. – **46**, № 8. – С. 954–961.

References

1. Babjeva I. P., Chernov I. Yu. Biology of yeast, Moscow: T-vo nauchn. izd. KMK, 2004 (in Russian).
2. Magomedova E. S., Abdullabekova D. A., Abramov Sh. A. Ecology of microorganisms, 2009, No 1: 99–102 (in Russian).
3. Ilyushkina L. N. Yeast fungi and their metabolic products, Rostov-na-Donu: YuFU, 2010 (in Russian).
4. Industrial Microbiology, Ed. N. S. Egorov, Moscow: Vysshaya shkola, 1989 (in Russian).
5. Burian N. I., Tyurin L. V. Microbiology of wine, Moscow: Pischevaya promyshlennost, 1979 (in Russian).
6. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A. Adv. Colloid Interface Sci., 2005, **118**: 125–172.
7. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena, New York: Taylor&Francis, 2013.
8. Egorov N. S. Fundamentals of Theory of Antibiotics, Moscow: Izd-vo Mosk. un-ta, Nauka, 2004 (in Russian).
9. Navashin S. M., Fomina I. P. Rational of therapy antibiotic, Moscow: Meditsina, 1982 (in Russian).
10. Mashkovsky M. D. Drugs, Moscow: Novaya volna, 2012 (in Russian).
11. Terenin A. N. Photonics of dye molecules and related organic compounds, Leningrad: Nauka, 1967 (in Russian).

12. Howes B. D., Guerrini L., Sanchez-Cortes S., Marzocchi M. P., Garcia-Ramos J. V., Smulevich G. J. Raman. Spectrosc., 2007, **38**: 859–864.
13. Biçer E., Ezzdemir S. Electrochimica Acta, 2010, **46**, No 8: 954–961 (in Russian).

Поступило в редакцію 14.10.2015

Т. В. Крупська

Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ

E-mail: krupska@ukr.net

Властивості композитної системи на основі високодисперсного кремнезему і рифампіцину

Методами ІЧ та УФ спектроскопії досліджено взаємодію частинок нанокремнезему з антибіотиком рифампіцином (Rif) у широкому діапазоні його концентрацій. Показано, що оптимальне покриття поверхні кремнезему досягається при концентрації Rif 0,4 ммоль/г. Виявлено стимулюючу дію композиту SiO₂-Rif на суспензію хлібопекарських дріжджів, що робить його перспективним для застосування в біотехнологічних циклах з використанням процесу бродіння з метою запобігання забрудненню дріжджів сторонніми мікроорганізмами.

Ключові слова: нанокремнезем, імпрегнування, рифампіцин, композитна система, дріжджові клітини.

T. V. Krupskaya

Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: krupska@ukr.net

Properties of a composite system based on fine-dispersed silica and rifampicin

By the methods of IR and UV spectroscopy, the interaction of nanosilica particles with the antibiotic rifampicin in a wide range of its concentrations is investigated. It is shown that the optimum silica surface coverage is achieved at a rifampicin concentration of 0.4 mmol/g. The stimulating effect of the SiO₂-Rif composite on the suspension of yeast cells is found. It is promising to apply the SiO₂-Rif composite in the biotechnological cycles using the fermentation process with the aim to prevent the contamination of yeast cells with microorganisms.

Keywords: nanosilica, impregnation, rifampicin, composite system, yeast cells.