



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-

© Т. В. Крупская, 2016

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 нанокомпозитной 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 $285 \text{ м}^2/\text{г}$ 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 ($\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$). Молекула Rif имеет разные функциональные группы, которые проявляют кислотно-основные 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 ($60 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 ч). В результате получено пять образцов композита SiO_2 -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 КВг при соотношении компонентов 1 : 5.

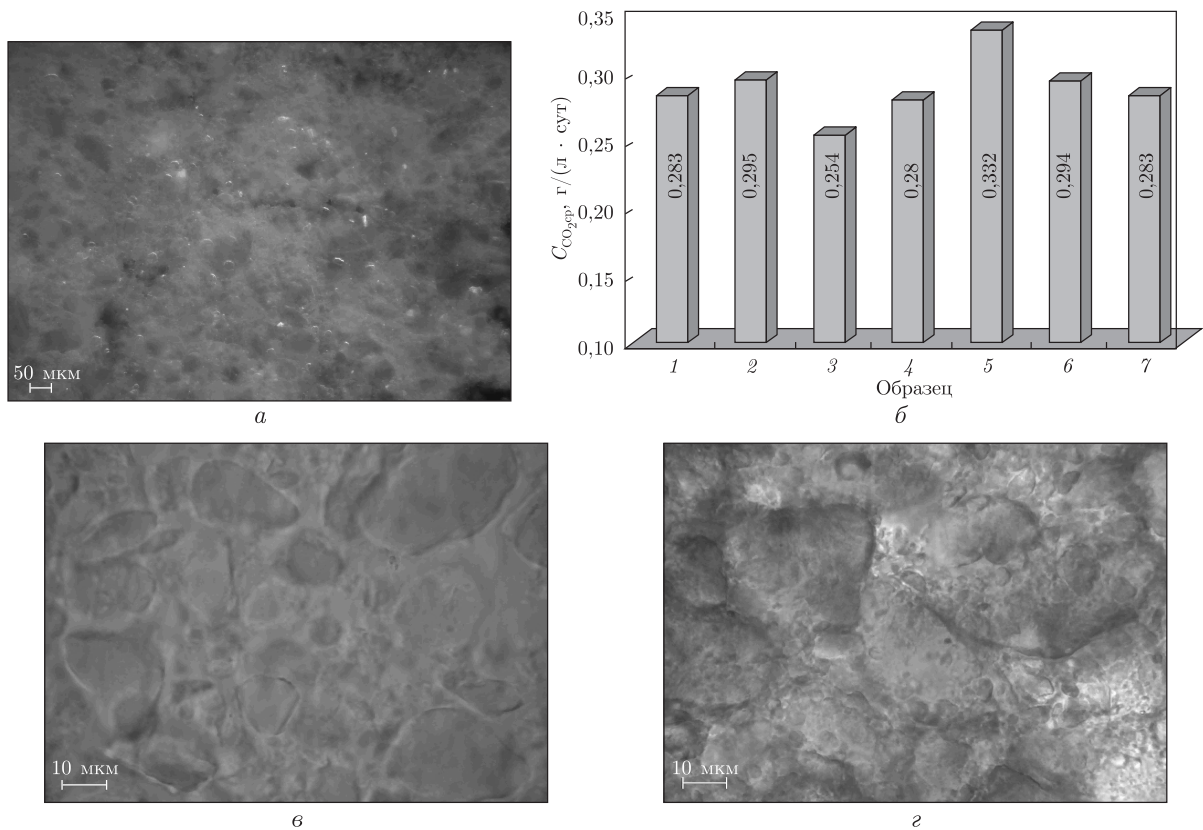


Рис. 1. Микрофотографии кремнезема, модифицированного Rif, в отраженном свете при увеличении $\times 100$: 0,2 ммоль/г (а); 0,4 ммоль/г (б); в режиме пропускания при увеличении $\times 1000$: 0,2 ммоль/г (в); 0,4 ммоль/г (г) в присутствии спирта

Микрофотографии частиц SiO₂-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 агломераты, которые состоят из агрегатов и первичных частиц, что является характерным для нанокремнеземов. При импрегнировании Rif поверхности кремнезема, благодаря желтой окраске, антибиотик и кремнезем 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).

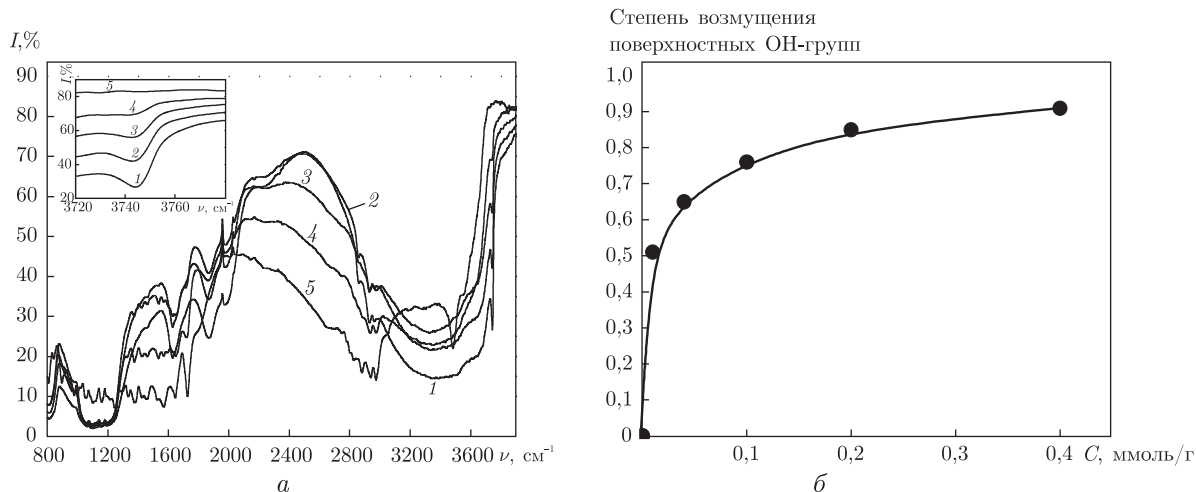


Рис. 2. ИК спектры композитов $\text{SiO}_2\text{-Rif}$ и их составляющих (а: 1 — SiO_2 ; композиты $\text{SiO}_2\text{-Rif}$: 2 — 0,01, 3 — 0,1, 4 — 0,4 ммоль/л Rif; 5 — чистый Rif); изменение степени возмущения поверхностных ОН-групп ВДК ($\nu = 3748 \text{ cm}^{-1}$) в зависимости от количества Rif 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, а). 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 $-\text{C-O-C}-$, которые при исследовании полученного композита, перекрываются полосой поглощения кремнезема. В композитной системе наблюдается смещение полос при 1721 , 1656 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 ОН-групп кремнезема возрастает и достигает максимального значения (0,91) при $C_{\text{Rif}} = 0,4 \text{ ммоль/г}$. Можно ожидать, что дальнейшее повышение концентрации приведет лишь к незначительному увеличению степени замещения свободных

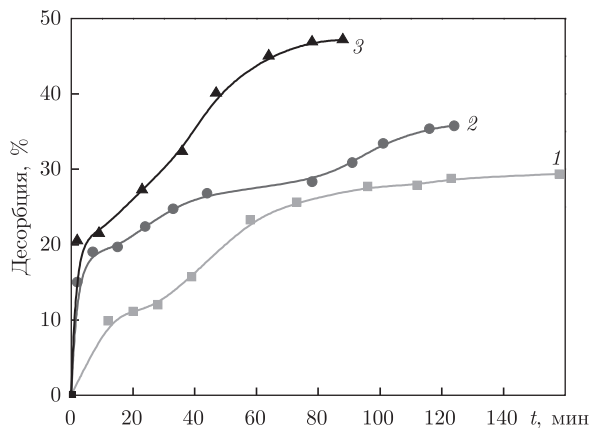


Рис. 3. Десорбция Rif ($C_{\text{Rif}} = 0,2$ ммоль/л) с поверхности кремнезема в разные среды: 1 — воду; 2 — физиологический раствор; 3 — спирт

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-

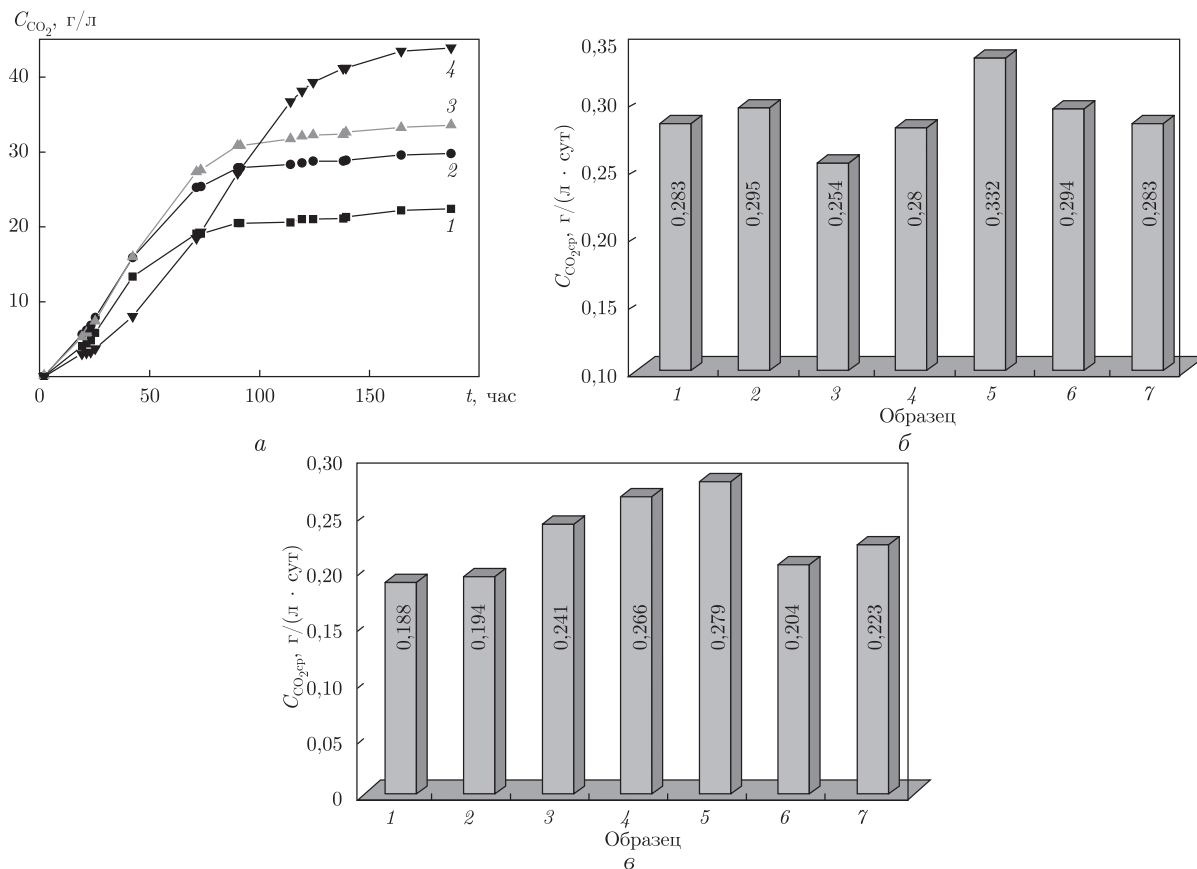


Рис. 4. Выделение углекислого газа суспензией клеток хлебопекарских дрожжей при действии Rif, кремнезема и композита SiO₂-Rif (а): 1 — контроль; 2 — 0,4 ммоль/г Rif; 3 — чистый Rif; 4 — ВДК; диаграмма выделения среднего количества углекислого газа суспензией клеток хлебопекарских дрожжей за 42 ч (б) 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. *Илюшкينا 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 Waterat 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 – рутина 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 редакцию 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.