

УДК 577.152.1

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМ БИОПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ
ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ**

П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Метод внутреннего гелеобразования (emulsification/internal gelation) является альтернативой экструзионному (внешнему) гелеобразованию в процессах инкапсуляции различных биологически активных веществ и иммобилизации ферментов [1]. Данный метод может использоваться для массового получения микросфер на основе альгината натрия малого диаметра (от десятков до сотен микрометров). Реакционная среда для получения гелевых шариков содержит, кроме альгината натрия, растительное масло, нерастворимый кальциевый комплекс, поверхностно-активное вещество и органическую кислоту. Внутреннее гелеобразование (желирование диспергированных в масляной фазе альгинатных капель) начинается с высвобождения катионов кальция из нерастворимого комплекса (соли кальция) посредством понижения pH [1, 2]. Таким образом, формирование микросфер происходит из водно-масляной эмульсии.

Целью работы был синтез альгинатных микросфер модифицированным методом внутреннего гелеобразования и оценка их внешних морфологических признаков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Альгинатные микросферы были получены с помощью модифицированного метода внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [2, 3]. Нерастворимый в воде карбонат кальция равномерно распределяется в растворе альгината, после чего добавляется растительное масло, содержащее поверхностно-активное вещество, и полученная смесь интенсивно перемешивается для образования водно-масляной эмульсии. Гелеобразование начинается с добавления органической кислоты, таким образом, сдвиг pH в диапазон низких значений провоцирует высвобождение ионов кальция из нерастворимой его соли. Кальций-альгинатные шарики формируются в процессе контактирования Ca^{2+} и альгината посредством образования ионного комплекса. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы раствором хлорида кальция.

0,08 г. микрокристаллического порошка карбоната кальция CaCO_3 добавляется в 20 мг 1,5 % раствора альгината при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергируется в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивается в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавляется 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжается в течение 10 минут. Далее в смесь добавляется 150 мл дистиллированной воды, перемешивание продолжается при меньшей интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляется 250 мл 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы. Масло удаляется из системы путем декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывается 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмываются несколько раз с помощью растворителя (в качестве которого могут использоваться вода, 1 % (об.) раствор Tween 80, ацетатный буферный раствор pH 4,0) до полного удаления следов масла, что контролировалось наблюдением в оптический микроскоп. Полученные частицы наблюдаются в световом поле оптического микроскопа при различных увеличениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства полученных микросфер – морфология, расположение, наличие и форма агрегатов, визуально оценивались с помощью оптического микроскопа Биомед-2. До начала промывки кальций-альгинатные гелевые частицы сферической формы преимущественно сгруппированы в отдельные кластеры, окруженные прозрачными оболочками (рисунок 1).

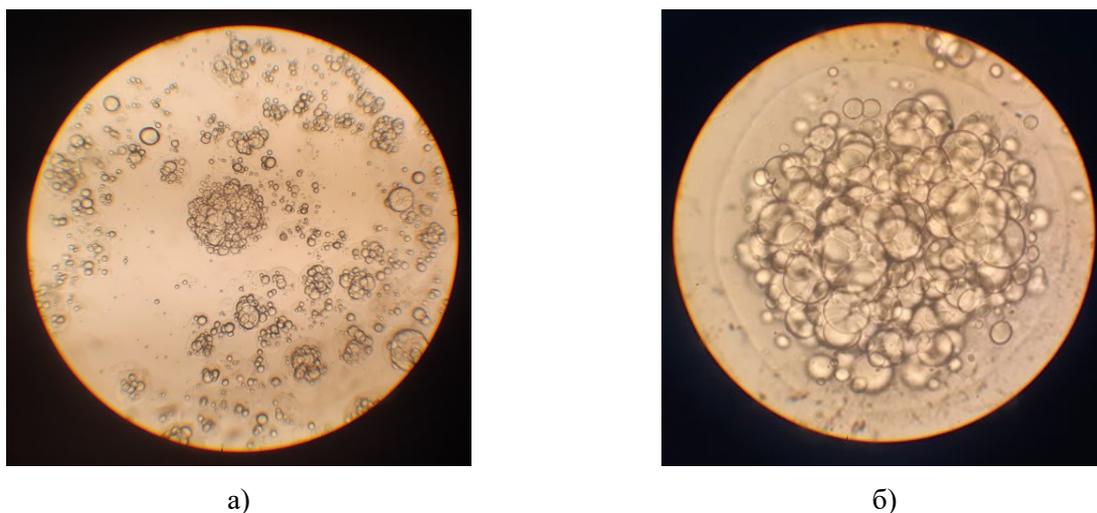


Рисунок 1 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, до промывки (присутствуют следы растительного масла): а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Осадок альгинатных частиц отмывается от масла несколько раз с помощью растворителя, в качестве которого были использованы дистиллированная вода, 1 % (об.) раствор Tween 80, ацетатный буферный раствор pH 4,0. Микроскопирование образцов альгинатных шариков после осуществления промывок различными растворителями показывает, что структура и форма агрегатов претерпевает в ходе промывания тем или иным растворителем определенные изменения. Следует отметить, что при этом во всех случаях промывка не только удаляет все следы масла из образцов, но и превращает агрегаты в более оформленные отдельные структуры, дробя слипшиеся и неоформленные «агрегаты» частиц.

Внешние свойства кластеров кальций-альгинатных микросфер представлены на рисунках 2–4.

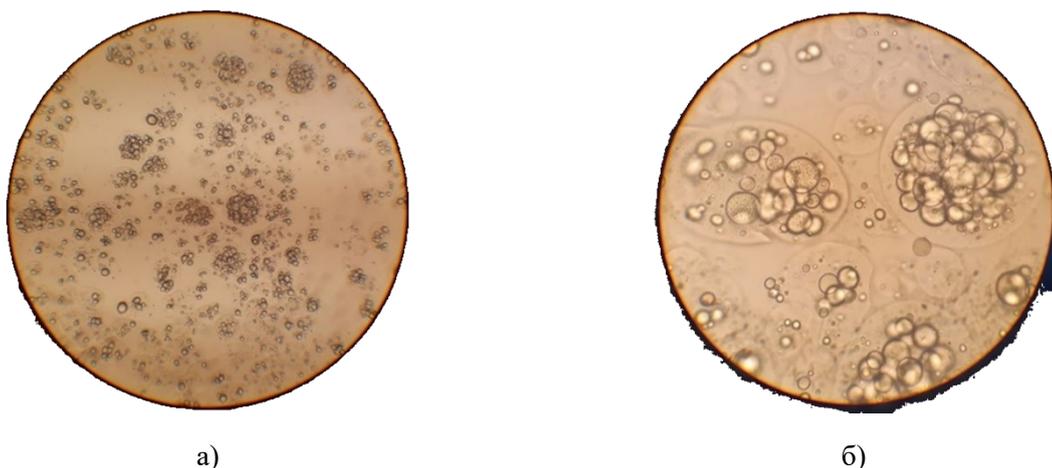


Рисунок 2 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки водой: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Очевидно, что промывка водой практически не изменяет изначальную структуру кластеров, не разбивая их на отдельные микросферы и не нарушая компоновки частиц внутри оболочек (рисунок 2). Промывка раствором сурфактанта (Tween 80) также не вносит кардинальных изменений в структуру агрегатов, оставляя такой же группировку микросфер внутри оболочек (рисунок 3).

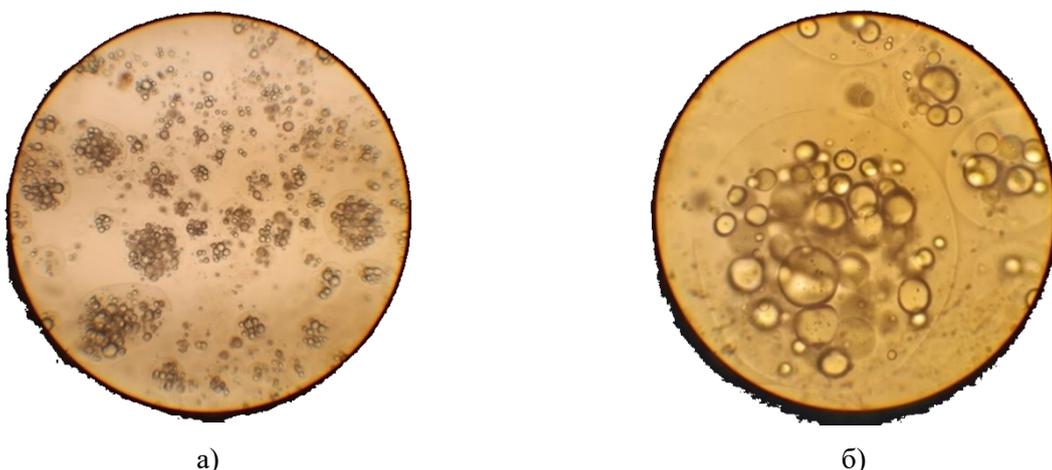


Рисунок 3 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки 1 % (об.) раствором Tween 80: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Промывка буферным раствором привносит заметные изменения в структуру агрегатов, растворяя их оболочку и таким образом разбивая кластеры, в результате чего микросферы отделяются друг от друга (рисунок 4). Таким образом, происходит постепенное разрушение изначальных плотных агрегативных структур.



а)

б)

Рисунок 4 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки ацетатным буферным раствором с pH 4,0: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

ВЫВОДЫ

С помощью модифицированной методики внутреннего гелеобразования были получены альгинатные микросферы. Морфология, расположение, наличие и форма агрегатов, визуально оценивались с помощью оптического микроскопа. Исследования показали существенные различия в форме и расположении микросфер, полученных с использованием различных растворителей при промывке.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 18–08–00424) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed M.M., Abd El-Rasoul S., Auda S.H., Ibrahim M.A. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles // Saudi Pharmaceutical Journal. 2013. Vol. 21. P. 61–69.
2. Wang X., Zhu K. – X., Zhou H. – M. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // International Journal of Molecular Sciences. 2011. Vol. 12. P. 3042–3054.
- 3 Poncelet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J.P., Neufeld R.J., Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation: Methodology // Appl. Microbiol. Biot. 1992. Vol. 38. P. 39–45.