

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 248496 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443565**

(22) Data zgłoszenia: **2023.01.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.07.29 BUP 31/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.12.22 WUP 51/2025**

(51) MKP:

C08L 5/08 (2006.01)

C08K 3/08 (2006.01)

C08J 5/18 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

PODKARPACKIE CENTRUM INNOWACJI

SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ

ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Rzeszów, PL

UNIWERSYTET RZESZOWSKI, Rzeszów, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MAŁGORZATA KUS-LIŚKIEWICZ,

Głogów Małopolski, PL

LESZEK POTOCKI, Raniżów, PL

BARTOSZ JAGUSZTYN, Rzeszów, PL

JUSTYNA MILAN, Rzeszów, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Krystian Żygadło, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania nanokompozytu na bazie polisacharydu – chitozanu, nanokompozyt otrzymany sposobem oraz zastosowanie nanokompozytu

PL 248496 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nanokompozytu na bazie naturalnego polisacharydu – chitozanu, nanoncząstek metalicznych oraz barwnika. Przedmiotem wynalazku jest również nanokompozyt i jego zastosowanie jako materiał opakowaniowy albo w biomedycynie, farmaceutyce lub medycynie.

W publikacjach naukowych "Development of noncytotoxic silver – chitosan nanocomposites for efficient control of biofilm forming microbes" (RSC Adv., 2017, 7, 52398), "Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles" (Salari et al., Food Hydrocolloids Volume 84, November 2018, Pages 414–423), "Bactericidal and catalytic performance of green nanocomposite based- on chitosan/carbon black fiber supported monometallic and bimetallic nanoparticles" (Ali et al., Chemosphere 188 (2017) 588–598), "The Removal of Brilliant Green Dye from Aqueous Solution Using Nano Hydroxyapatite/Chitosan Composite as a Sorbent" (Ragab et al., Molecules 2019, 24, 847) czy w zgłoszeniu międzynarodowym WO2020149756A2 lub zgłoszeniu amerykańskim US2021361570A1 opisano kompozyty na osnowie chitozanu zawierające nanocząstki metaliczne lub hydroksyapatyt. Natomiast w publikacji naukowej "Incorporation of silver nanoparticles/curcumin/clay minerals into chitosan film for enhancing mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity" (Li et al., International Journal of Biological Macromolecules 223 (2022) 779–789) opisano kompozyt o właściwościach antybakteryjnych i antyoksydacyjnych na osnowie chitozanu zawierający nanocząstki srebra, barwnik – kurkuminę oraz glinę.

Problemem technicznym stawianym przed wynalazkiem jest zapewnienie łatwego do przeprowadzenia sposobu otrzymywania nanokompozytu o właściwościach przeciwbakteryjnych, który mógłby być stosowany zarówno w postaci stałej jak i ciekłej. Innym problemem jest zapewnienie nanokompozytu na bazie chitozanu, który wykazywałby właściwości antyoksydacyjne i fotoprotekcyjne oraz nie byłby toksyczny względem fibroblastów i keratynocytów.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kompozytu na bazie chitozanu, obejmujący etap biotechnologicznego przygotowania aktywnego barwnika, etap przygotowania nanocząstek metalicznych, wytworzenie ciekłego nanokompozytu, charakteryzujący się tym, że do 30 cm³ roztworu chitozanu o stężeniu 2% (w/v) dodaje się aktywny barwnik, który stanowi piomelanina, do końcowego stężenia 200 µg/dm³ i 3 cm³ koloidalnego roztworu nanocząstek srebra o stężeniu 400 µg/cm³, opcjonalnie do mieszaniny dodaje się hydroksyapatyt w ilości 1% wagowego względem objętości mieszaniny, i miesza się w temperaturze pokojowej aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny.

W korzystnej realizacji wynalazku średnia wartość średnicy hydrodynamicznej nanocząstek srebra wynosi 78 nm.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku piomelaninę otrzymuje się sposobem biotechnologicznym ze szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* W29.

W korzystnej realizacji wynalazku otrzymany ciekły kompozyt wylewa się na podłoże teflonowe w celu uzyskania cienkiego filmu, następnie poddaje się inkubacji w czasie 48 godzin w temperaturze 22°C przy braku dostępu światła w celu zestalenia cienkiego filmu.

Drugim przedmiotem wynalazku jest nanokompozyt na bazie chitozanu, stanowiącego osnowę nanokompozytu, zawierający aktywny barwnik i nanocząstki srebra, charakteryzujący się tym, że aktywny barwnik stanowi piomelanina, i stosunek wagowy piomelaniny do nanocząstek srebra i do chitozanu w kompozycie wynosi odpowiednio 1:2:1, opcjonalnie nanokompozyt zawiera hydroksyapatyt w ilości 1% wagowego kompozytu.

W korzystnej realizacji wynalazku średnia wartość średnicy średnia wartość średnicy hydrodynamicznej nanocząstek srebra wynosi 78 nm.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku kompozyt ma postać cienkiego filmu albo zawiesiny.

Innym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie nanokompozytu na bazie chitozanu w postaci folii jako materiału opakowaniowego do żywności. Nanokompozyt według wynalazku znajduje również zastosowanie jako materiał opatrunkowy w leczeniu ran. Nanokompozyt w tym zastosowaniu może być używany w postaci zawiesiny lub zestalonej. Jeszcze innym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie nanokompozytu na bazie chitozanu do regeneracji ubytku tkanki kostnej.

Sposób wytwarzania materiału kompozytowego jest unikalny, z uwagi na wykorzystanie komponentów pozyskiwanych mikrobiologicznie. W celu syntezy materiału zastosowano łatwą, tanią i szybką procedurę uzyskania kompozytu poprzez mieszanie roztworu chitozanu, barwnika piomelaniny, nanocząstek srebra oraz ewentualnie domieszkowanie hydroksyapatytem. Synteza odbywa się w warunkach

łatwych do odtworzenia, tj. w temperaturze pokojowej, a w przypadku postaci stałej stosuje się dodatkowo zaciemnienie.

Materiał kompozytowy może mieć różnego rodzaju zastosowanie. Możliwe jest stosowanie go do aplikacji biomedycznych, farmaceutycznych i jako materiał regeneracyjny z uwagi na brak negatywnego wpływu na aktywność metaboliczną testowanych linii komórek ludzkich fibroblastów i keratynocytów. Z uwagi na zawartość barwnika w tym kompozycie, materiał posiada właściwości antyoksydacyjne i fotoprotekcyjne, stąd możliwe są aplikacje jako forma do materiałów opakowaniowych, plastikowych form ochron przeciwślonecznych. Kompozyt cechuje także potencjał biobójczy, zarówno względem szczepów bakteryjnych jak i grzybowych. Z tego względu może znaleźć zastosowanie jako forma alternatywna na przykład względem antybiotyków do zwalczania patogenów. Dalej, takie jego właściwości pozwalają na zastosowanie go jako forma pokrywania materiałów, które mają mieć potencjał przeciwdrobnoustrojowy.

Przykłady realizacji wynalazku zobrazowano na rysunku, gdzie: Fig. 1 przedstawia zmianę barwy podczas syntezy barwnika w hodowli bioreaktorowej w czasie 7 dni inkubacji, Fig. 2 przedstawia widmo absorpcyjne koloidu nanocząstek srebra, Fig. 3 rozkład zakresu rozmiarów nanocząstek srebra w koloidzie, Fig. 4 przedstawia materiał kompozytowy w postaci ciekłej (4A) i stałej, cienkiej folii (4B), Fig. 5 przedstawia liczebność kolonii mikroorganizmów po ekspozycji wobec roztworu materiału kompozytowego (* oznacza całkowitą redukcję populacji mikroorganizmów), Fig. 6 przedstawia aktywność metaboliczną komórek linii HaCaT (6A) oraz HDFn (6B) po ekspozycji wobec wycieków z materiału kompozytowego (Ch@AgNPs/Pyo), chitozanu (Ch) i chitozanu z nanocząstkami srebra (Ch@AgNPs), Fig. 7 przedstawia wpływ testowanych materiałów na wzrost mikroorganizmów *Staphylococcus aureus* (7A) i *Escherichia coli* (7B) (identyfikacja stref zahamowania wzrostu), Fig. 8 przedstawia liczebność kolonii mikroorganizmów po ekspozycji wobec roztworu materiału kompozytowego domieszkowanego hydroksypatytem (* oznacza całkowitą redukcję populacji mikroorganizmów).

Przykład nr 1 Materiał kompozytowy do zastosowań jako folie opakowaniowe o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Barwnik pozyskano ze szczepu *Yarrowia lipolytica* W29, po inkubacji drożdży w bioreaktorze. Do naczynia bioreaktora Lambda Minifor (Lambda Instruments) dodano sterylną pożywkę YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma-Aldrich) wzbogaconą L-tyrozyną (1 g/L), asparaginą (1 g/L), glicyną (1 g/L), glukozą (10 g/L) i $MnSO_4$ (0,15 g/L). Podłoże zaszczerpiono inokulum drożdży do uzyskania wyjściowego OD600 0,2. Hodowle inkubowano przy napowietrzaniu 0,1 L/min, temperaturze 30°C i stałym mieszaniu 0,5 Hz. Inkubację prowadzono przez siedem dni. Tworzenie się barwnika zidentyfikowano poprzez obserwację zmiany zabarwienia następującą w czasie trwania hodowli (Fig. 1). Pigment poddano ekstrakcji zgodnie z protokołem podanym w "Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*" (I. Ben Taharet et al., Biotechnol Prog 2020 Mar; 36(2):e2912).

Nanocząstki srebra (Ag NanoParticles) wytworzono z wykorzystaniem działania ultradźwięków, z użyciem cytrynianu trisodowego (CAS 6132-04-3) i azotanu srebra (CAS 7761-88-8). Do 1 mM roztworu $AgNO_3$ dodano 1/10 objętości 35 mM roztworu cytrynianu trisodowego. Mieszaninę poddano działaniu ultradźwięków przez 5 min przy mocy 130 W. Roztwór przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PVDF 0,22 μm . Proces syntezy nanocząstek srebra potwierdzono wykonując widma absorpcji w zakresie długości fal 300–800 nm na spektrofotometrze Tecan Infinite® 200 PRO. Figura 2 wskazuje widmo absorpcji uzyskane dla zsyntetyzowanych nanocząstek srebra, z jej charakterystycznym pikiem absorpcji przy długości fali 430 nm. Stężenie nanocząstek srebra w koloidzie wynosiło 400 $\mu g/mL$. Osnowę materiału nanokompozytowego stanowił naturalny polimer – chitozanu. Została ona wytworzona z 2% roztworu tego związku, który został otrzymany jak poprzez rozpuszczenie 2 g chitozanu (*Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures*, Vol. 69, 2016, 256–261) w odpowiedniej objętości 0,1 M kwasu octowego (Sigma-Aldrich, CAS 9012-76-4)), po czym zawiesinę mieszano na mieszadle magnetycznym przez 12 h w temperaturze 45°C. Do 30 mL tak przygotowanego roztworu chitozanu dodano barwnik (piomelaninę otrzymaną jak powyżej) do końcowego stężenia 0,2 g/L oraz 3 mL otrzymanego jak powyżej roztworu koloidalnego nanocząstek srebra o średnicy hydrodynamicznej 78 nm i stężeniu 400 $\mu g/mL$ (Fig. 3). W tak otrzymanej mieszaninie, biorąc pod uwagę podane powyżej stężenia, stosunek wagowy składników wynosi 0,006 (1 część wagowa chitozanu): 0,012 (2 części wagowe AgNP): 0,006 (1 część wagowa piomelaniny). Taką mieszaninę poddaje się mieszanii w temperaturze pokojowej aż do homogenizacji. Następnie kompozyt w formie zawiesiny oceniono pod kątem

potencjału przeciwdrobnoustrojowego. W tym celu, w równych objętościach, do kompozytu dodano inokulum hodowli 24-godzinnej zawiesiny testowanego szczepu do początkowego OD600 0,1. Próby inkubowano przez 24 h w cieplarni z wytrząsaniem (120 rpm) w temperaturze 30°C lub 37°C, odpowiednio dla szczepu grzybów i bakterii. W czasie początkowym i po 24 h na szalki z podłożem wysiano próby i zliczono wyrosłe kolonie. W celu określenia potencjału przeciwdrobnoustrojowego, porównano ilość jednostek tworzących kolonie w materiale kontrolnym i poddanym ekspozycji wobec kompozytu. Materiał wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* PCM 2209, Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz grzyba *Candida albicans* ATCC 14053 (Fig. 5). W dalszej części badań, przygotowano formę stałą badanego kompozytu, tj. folii. W tym celu materiał wylano na podłoże teflonowe i poddano suszeniu w temperaturze 22°C przez 48 h w ciemności (dla uniknięcia absorpcji światła przez komponenty) celem ich zestalenia. Po inkubacji otrzymano materiał w postaci stałej matowej folii, której grubość nie przekracza 1 mm (Fig. 4B). Najbardziej użyteczną postacią kompozytu jest postać stała, tj. folia. Jednakże w celu ilościowej oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych zbadano kompozyt w postaci zawiesiny, gdyż forma stała daje tylko wyniki poglądowe, jakościowe. Ocena ilościowa polegała na zliczaniu jednostek tworzących kolonie (CFU, *Colony Forming Units*). W związku z cechami jakie posiada barwnik, które opublikowano w pracy "*Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast Yarrowia lipolytica*" (I. Ben Tahar et al., *Biotechnol Prog* 2020 Mar; 36(2):e2912) wytworzona folia ma właściwości antyoksydacyjne oraz fotoprotekcyjne. Może mieć zastosowanie jako materiał opakowaniowy hamujący rozwój patogenów i chroniący żywność przed psuciem.

Przykład nr 2 Materiał kompozytowy do zastosowań jako materiał stosowany do leczenia ran

Barwnik pozyskano ze szczepu *Yarrowia lipolytica* W29 jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym. Nanocząstki srebra wytworzono jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym.

Materiał kompozytowy w formie zawiesiny wytworzono a następnie poddano analizie pod względem oceny potencjału przeciwdrobnoustrojowego tak, jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym. Materiał wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* PCM 2209, Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz grzyba *Candida albicans* ATCC 14053 (Fig. 5). Kompozyt w formie zawiesiny testowano na określenie stopnia cytotoksyczności względem ssaczych komórek eukariotycznych. W tym celu na płytce 12-dołkowej wylano po 400 µL materiału kompozytowego (Ch@AgNPs/Pyo) oraz roztworu chitozanu. Płytki poddano suszeniu w temperaturze 50°C przez 24 h. Następnie materiał poddano neutralizacji poprzez inkubację kompozytu w dołku wobec 0,5 M roztworu NaOH. W kolejnym kroku przeprowadzono płukanie dołków buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*). Płytki poddano ponownemu wysuszeniu i sterylizacji pod lampą UV przez 15 minut. Do tak przygotowanych płytek podano po 0,5 mL podłoża DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) suplementowanego 10% surowicą FBS (Sigma-Aldrich) oraz roztworem antybiotyków do hodowli Atimycotic (Sigma-Aldrich). Płytki inkubowano przez dalsze 24 h w standardowych warunkach do prowadzenia hodowli, tj. w temperaturze 37°C, wysyceniu CO₂ 5% oraz przy 95% wilgotności. Następnie pożywkę zebrano i wykonano analizę widma absorpcji w zakresie światła 300–800 nm, celem określenia czy z materiału kompozytowego uwalniane są nanocząstki srebra. Nie zaobserwowano obecności charakterystycznego pików absorpcji przy 430 nm, stąd wniosek, że materiał kompozytowy nie uwalnia AgNPs do środowiska. W kolejnym etapie określono czy wyciek pobrany z materiału kompozytowego wpływa na aktywność metaboliczną komórek. Analizę wykonano według standardowego protokołu, opisanego w publikacji "*Green pyomelanin-mediated synthesis of gold nanoparticles: modelling and design, physico-chemical and biological characteristics*" (I. Ben Tahar et al., *Microbial Cell Factories* volume 18, Article number: 210 (2019)). W testowanych liniach komórkowych; ludzkich fibroblastach (HDFn, ATCC-PCS-201-010) oraz keratynocytach (HaCaT, CLS) nie stwierdzono negatywnego oddziaływania na aktywność metaboliczną komórek po ekspozycji wobec testowanego materiału (Fig. 6A i 6B). Materiał zatem nie wykazuje cytotoksyczności. Dodatkowo, właściwości samego barwnika opisano jako pozytywnie wpływający komponent na zdolność do migracji komórek ("*Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast Yarrowia lipolytica*", I. Ben Tahar et al., *Biotechnol Prog* 2020 Mar; 36(2):e2912). Zatem dodatek tego komponentu do materiału kompozytowego będzie stymulował proces gojenia ran. W związku z cechami jakie posiada barwnik i wytworzony kompozyt, materiał ten może mieć zastosowanie jako materiał stosowany w leczeniu ran, zarówno w formie zawiesiny jak i stałej.

Przykład 3 Materiał kompozytowy do zastosowań w biomedycynie i farmaceutyce

Barwnik pozyskano ze szczepu *Yarrowia lipolytica* W29 jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym. Nanocząstki srebra wytworzono jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym. Materiał kompozytowy w formie zawiesiny wytworzono jak zostało to opisane w przykładzie pierwszym, przy czym do wariantu kompozytu chitozanu domieszkowanego AgNPs i barwnikiem (Ch@AgNPs/Pyo) dodano 1% w/v hydroksyapatytu (względem objętości zawiesiny kompozytu). Następnie kompozyty, w różnych wersjach składowych tj. chitozan domieszkowany AgNPs (Ch@AgNPs), chitozan domieszkowany AgNPs i barwnikiem (Ch@AgNPs/Pyo) oraz chitozan domieszkowany AgNPs, barwnikiem i hydroksyapatytem (Ch@AgNPs/Pyo/HAP), wylano na podłoże teflonowe celem zestalenia w warunkach jak opisano w przykładzie 1. Kompozyt w formie zestalonej folii testowano dla oceny potencjału przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* PCM 2209 i bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Wykonano test oceny zahamowania wzrostu. Na szalki z agarom odżywczym wsiano po 100 μ L 24-godzinnego inokulum odpowiedniego szczepu bakterii a następnie nałożono fragmenty testowanych wariantów folii; chitozan domieszkowany AgNPs (Ch@AgNPs), chitozan domieszkowany AgNPs i barwnikiem (Ch@AgNPs/Pyo) oraz chitozan domieszkowany AgNPs, barwnikiem i hydroksyapatytem (Ch@AgNPs/Pyo/HAP). Po 24 h inkubacji w cieplarni w temperaturze 37°C, oceniono stopień zahamowania wzrostu poprzez oznaczenie przejaśnienia widocznego w murawie bakterii. Na Fig. 7A i 7B widoczne są zdjęcia ze wskazanymi niewielkimi zonami inhibicji wzrostu. Dla określenia ilościowego stopnia hamowania proliferacji komórek badanych mikroorganizmów, przeprowadzono test oceniający stopień zahamowania wzrostu mikroorganizmów po ekspozycji wobec zawiesiny kompozytu, wariantu chitozanu domieszkowanego AgNPs, barwnikiem i hydroksyapatytem (Ch@AgNPs/Pyo/HAP). W tym celu, w równych objętościach, do kompozytu dodano inokulum hodowli 24-godzinnej zawiesiny testowanego szczepu do początkowego OD600 0.1. Próby inkubowano przez 24 h w cieplarni z wytrząsaniem (120 rpm) w temperaturze 30°C lub 37°C, odpowiednio dla szczepów grzybów i bakterii. W czasie początkowym i po 24 h na szalki z podłożem wysiano próby i zliczono wyrosłe kolonie. W celu określenia potencjału przeciwdrobnoustrojowego, porównano ilość jednostek tworzących kolonie w materiale kontrolnym i poddanym ekspozycji wobec kompozytu. Materiał kompozytowy domieszkowany hydroksyapatytem wykazuje właściwości bójcze względem bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* PCM 2209, bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz szczepu grzyba *Candida albicans* ATCC 14053 (Fig. 8). Oceniono stabilność i toksyczność materiału kompozytowego domieszkowanego hydroksyapatytem. W tym celu formę ciekłą w objętości 0,4 mL wylano do dołków na płytkę 12-dołkową i poddano suszeniu w temperaturze 50°C przez czas 24 h. Następnie, zestalony kompozyt neutralizowano (0,5M NaOH) i płukano roztworem PBS. Płytkę wysuszono i sterylizowano pod lampą UV przez 15 minut. Do tak przygotowanych kompozytów dodano podłoże DMEM suplementowane 10% surowicą i zestawem antybiotyków do hodowli (Sigma-Aldrich). Inkubację płytek prowadzono przez 24 h w warunkach standardowej hodowli komórek, po czym zebrano pożywkę i poddano analizie wycieku nanocząstek srebra. W tym celu wykonano widmo absorpcji w zakresie 300–800 nm. W obrazie nie stwierdzono charakterystycznego piksu przy 430 nm, stąd wniosek, że materiał jest stabilny i nie uwalnia do środowiska AgNPs. Oszacowano też toksyczność wycieku, poprzez analizę aktywności metabolicznej komórek. Zastosowano standardową procedurę opisaną w "Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*", (I. Ben et al., Biotechnol. Prog. 2020 Mar; 36(2):e2912)). Nie zanotowano negatywnego oddziaływania wycieku na aktywność metaboliczną testowanych komórek, linii HaCaT oraz HDFn. Ponadto, obecność w kompozycie barwnika, zgodnie z jego właściwościami (praca cytowana powyżej), pozytywnie wpływa na zdolność migracji komórek. Tak wytworzony kompozyt domieszkowany hydroksyapatytem może mieć zastosowanie jako materiał regeneracyjny w leczeniu schorzeń związanych z ubytkami tkanki kostnej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nanokompozytu na bazie chitozanu, obejmujący etap biotechnologicznego przygotowania aktywnego barwnika, etap przygotowania nanocząstek metalicznych, wytworzenie ciekłego nanokompozytu, **znamienny tym**, że do 30 cm³ roztworu chitozanu o stężeniu 2% (w/v) dodaje się aktywny barwnik, który stanowi piomelanina, do końcowego stężenia 200 μ g/cm³ i 3 cm³ koloidalnego roztworu nanocząstek srebra o stężeniu 400 μ g/cm³,

opcjonalnie do mieszaniny dodaje się hydroksyapatyt w ilości 1% wagowego względem objętości mieszaniny, i miesza się w temperaturze pokojowej aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że średnia wartość średnicy hydrodynamicznej nanocząstek srebra wynosi 78 nm.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że piomelaninę otrzymuje się sposobem biotechnologicznym ze szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica W29*.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że otrzymany ciekły kompozyt wylewa się na podłoże teflonowe w celu uzyskania cienkiego filmu, następnie poddaje się inkubacji w czasie 48 godzin w temperaturze 22°C przy braku dostępu światła w celu zestalenia cienkiego filmu.
5. Nanokompozyt na bazie chitozanu, stanowiącego osnowę nanokompozytu, zawierający aktywny barwnik i nanocząstki srebra, **znamienny tym**, że aktywny barwnik stanowi piomelanina, i stosunek wagowy piomelaniny do nanocząstek srebra i do chitozanu w kompozycie wynosi odpowiednio 1:2:1, opcjonalnie nanokompozyt zawiera hydroksyapatyt w ilości 1% wagowego kompozytu.
6. Nanokompozyt według zastrz. 5, **znamienny tym**, że średnia wartość średnicy hydrodynamicznej nanocząstek srebra wynosi 78 nm.
7. Nanokompozyt według zastrz. 5, **znamienny tym**, że ma postać cienkiego filmu albo zawiesiny.
8. Zastosowanie nanokompozytu na bazie chitozanu określonego w zastrzeżeniach 5–7 w postaci folii jako materiału opakowaniowego do żywności.
9. Zastosowanie nanokompozytu na bazie chitozanu określonego w zastrzeżeniach 5–7, jako materiału opatrunkowego w leczeniu ran.
10. Zastosowanie nanokompozytu na bazie chitozanu określonego w zastrzeżeniach 5–7 do regeneracji ubytku tkanki kostnej.

Rysunki

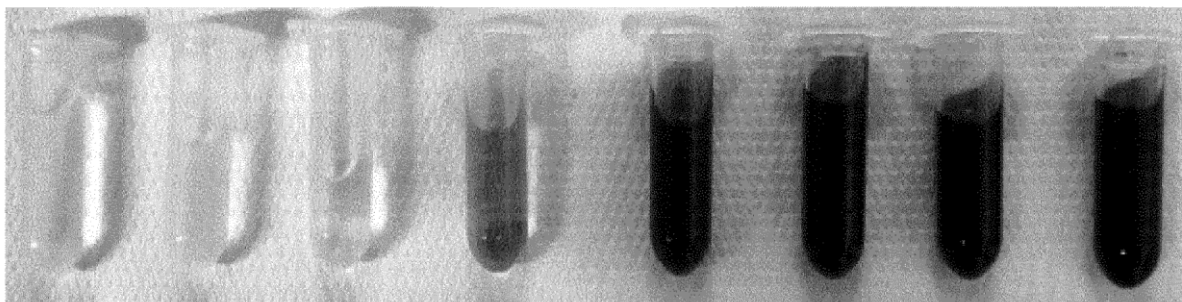


Fig. 1

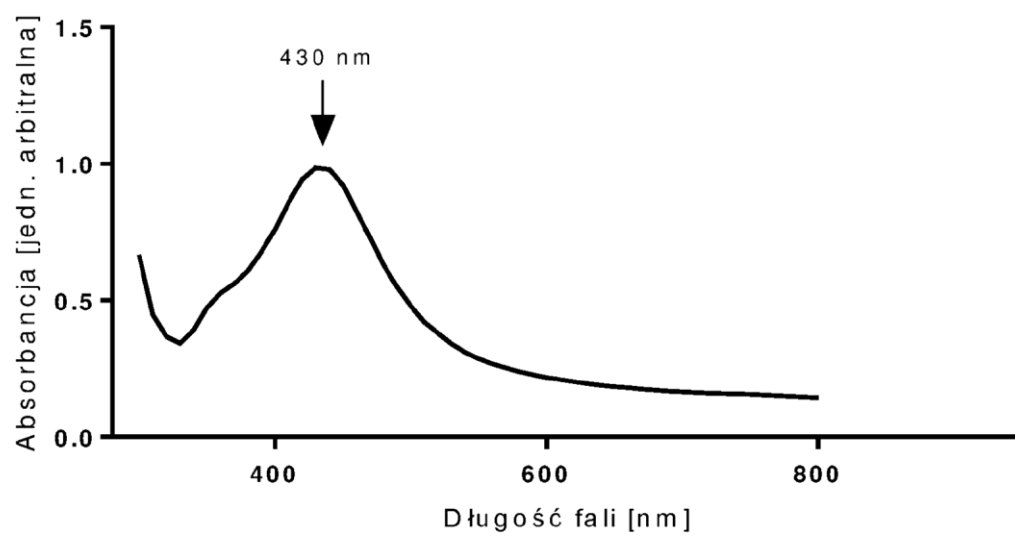


Fig. 2

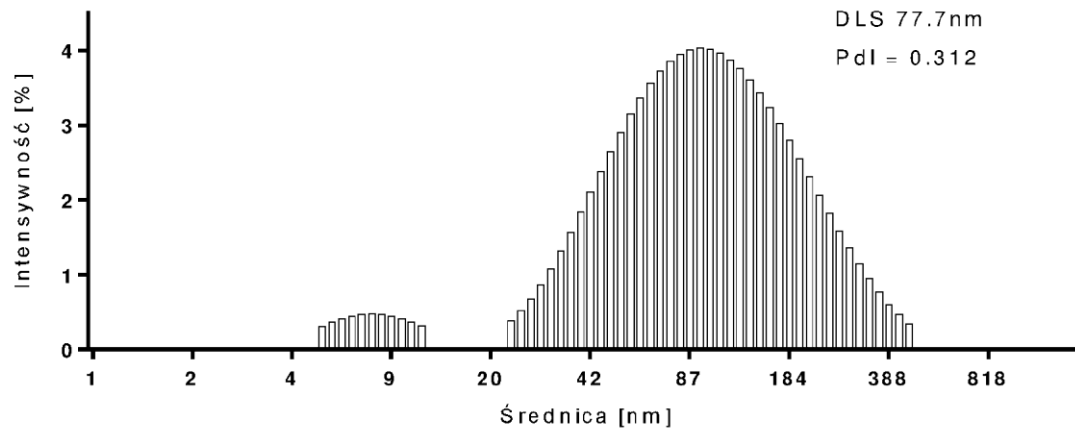


Fig. 3



Fig. 4a

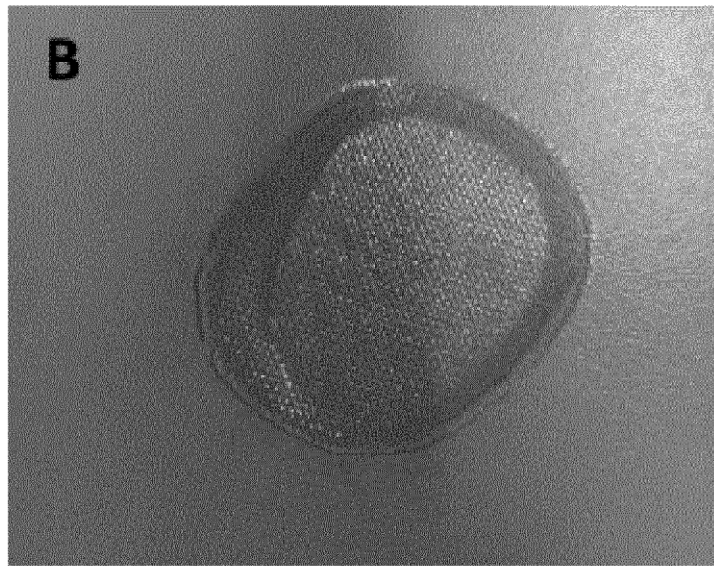


Fig. 4b

Wpływ materiału na mikroorganizmy
(wyrażony jako spadek ilości CFUw populacji)

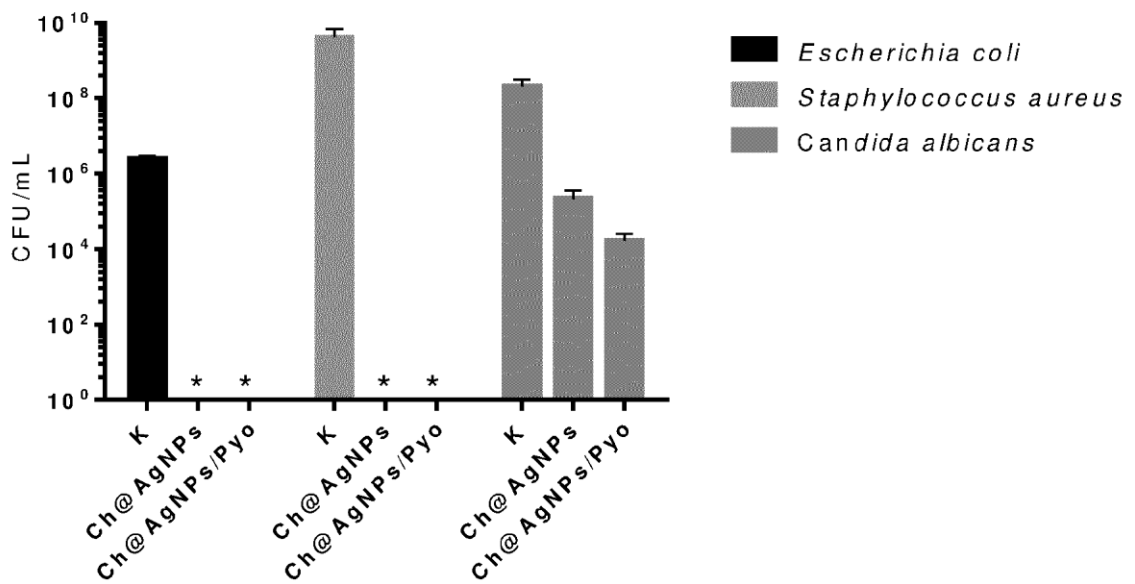


Fig. 5

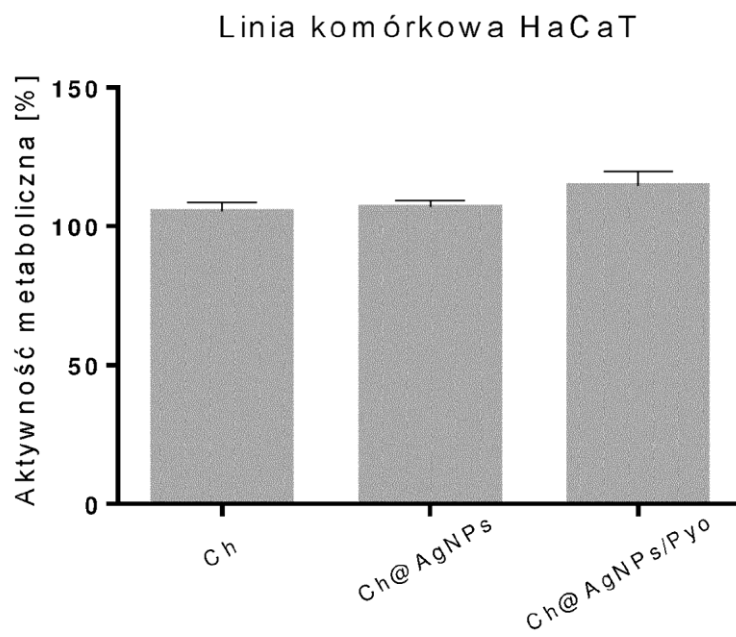


Fig. 6A

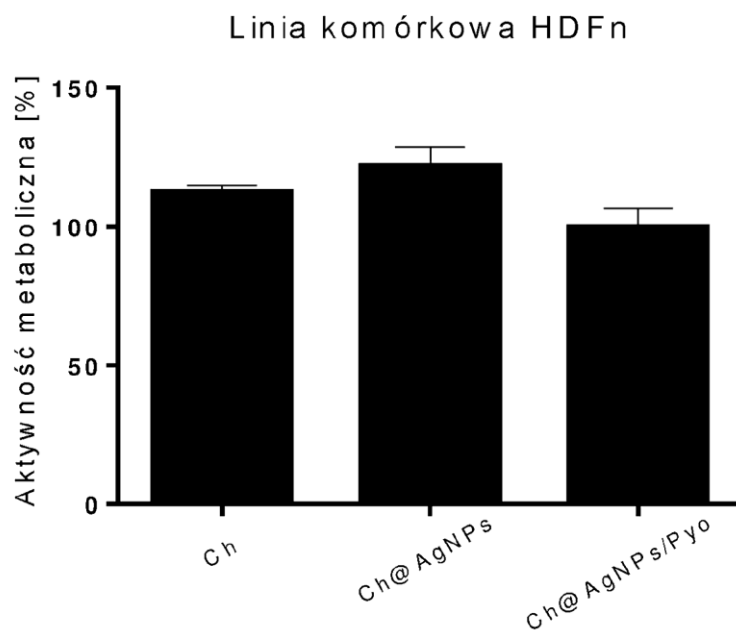


Fig. 6B

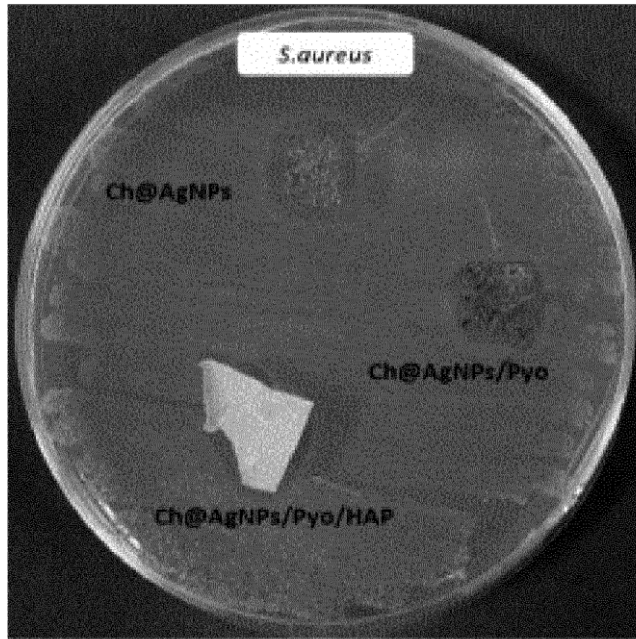


Fig. 7A

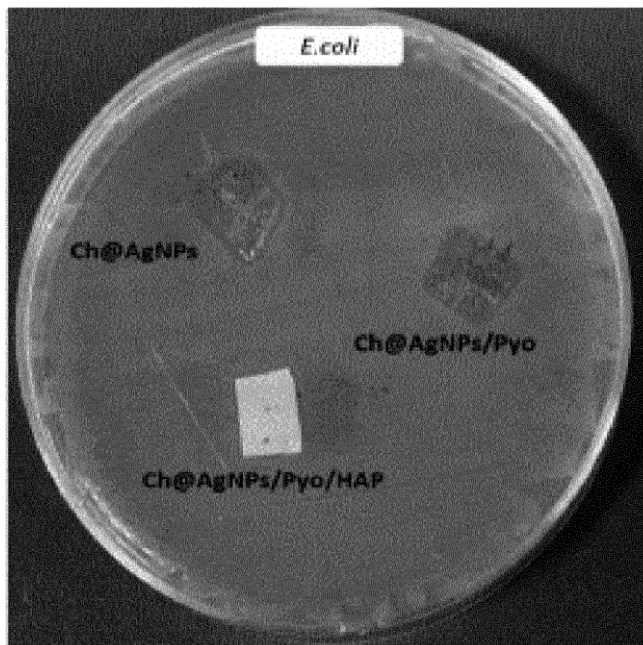


Fig. 7B

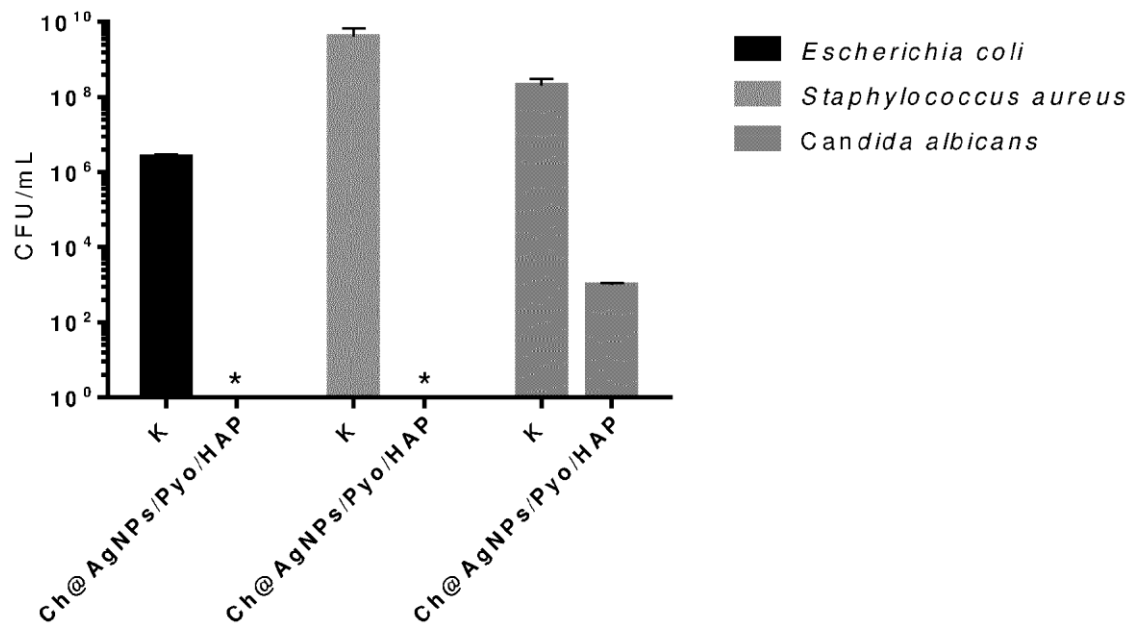


Fig. 8