

Sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej. Otrzymana celuloza bakteryjna jest polisacharydem syntetyzowanym przez drobnoustroje, który może być zastosowany w postaci płatków czystych, wilgotnych lub suszonych, wzbogaconych w dodatkowe materiały czynne w celu zwiększenia efektywności stosownego opatrunku. Głównym obszarem zastosowania celulozy bakteryjnej jest medycyna (materiał opatrunkowy, implanty naczyń i organów, materiał do unieruchamiania białek), kosmetologia (stabilizator emulsji), przemysł tekstylny (wysoko wyspecjalizowane tkaniny, „sztuczna skóra”), papiernictwo (produkcja papieru o specjalnych właściwościach), ochrona środowiska (oczyszczanie wody, absorpcja toksyn i ścieków ropopochodnych), przemysł spożywczy (jadalna celuloza, opakowania), akustyka (membrany głośnikowe).

Celuloza bakteryjna, cechująca się wysokim stopniem krystaliczności, jest nierozgałęzionym homopolisacharydem, zbudowanym z jednostek β ,D-glukopiranozy połączonych ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Synteza celulozy przez mikroorganizmy jest dwuetapowa: polimeryzacja cząsteczek glukozy w liniowy β -1,4-glukan oraz łączenie i krystalizację indywidualnych łańcuchów polimerowych w większe struktury.

W zastosowaniach medycznych i dermatologiczno-kosmetycznych wymagana jest celuloza bakteryjna charakteryzująca się wysoką czystością, wytrzymałością mechaniczną, zdolnością do wchłaniania cieczy, biokompatybilnością z żywą tkanką (szczególnie z krwią), porowatością, elastycznością oraz zdolnością do immobilizacji różnorodnych substancji mających właściwości bioaktywne, przyspieszające właściwości lecznicze. Dodatkowo celuloza bakteryjna może zawierać związki o działaniu bakteriostatycznym, bakteriobójczym, angiogennym lub czynniki wzrostu.

Proces produkcji celulozy bakteryjnej napotyka pewne trudności związane z wyselekcjonowaniem szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wgłębnej oraz kosztami związanymi z zastosowaniem odpowiednich składników podłoża hodowlanego. W praktyce spotyka się dwie metody produkcji celulozy bakteryjnej: stacjonarną (prowadzoną w sposób jednoetapowy poprzez zaszczepienie 5-10% wag. inokulum do pożywki hodowlanej lub dwuetapowy – etap hodowli wgłębnej w celu namnożenia biomasy oraz kontynuację procesu w warunkach

stacjonarnych) oraz dynamiczną (np. z zastosowaniem mieszania mechanicznego). Hodowle w reaktorach z mieszaniem mechanicznym mogą charakteryzować się niestabilnością, polegającą na występowaniu ukierunkowanej tendencji do tworzenia mutacji, czyli szczepów *Cel⁻* wpływających na wydajność produkcji biomateriału. Proces namnażania szczepów aktywnych, tzw. *Cel⁺* jest silnie związany z zapewnieniem odpowiedniej szybkości rozpuszczania tlenu oraz odnawianiem powierzchni wymiany masy na granicy pożywka-powietrze.

W literaturze opisanych jest wiele sposobów prowadzenia procesu produkcji celulozy bakteryjnej odznaczającej się wysoką czystością chemiczną, higroskopijnością, biokompatybilnością, biofunkcjonalnością oraz barkiem toksyczności.

W opisie patentowym PL 171952 przedstawiono sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej w postaci błon na drodze hodowli powierzchniowej bakterii *Acetobacter xylinum* P23 na podłożu agarowym opartym o glukozę. Uzyskane błony o zawartości 90-97% α -celulozy mogą być stosowane jako środek opatrunkowy w chirurgii i dermatologii.

Opis patentowy PL 185337 dotyczy sposobu wytwarzania celulozy bakteryjnej z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum* w postaci błon stosowanych, jako biomateriał opatrunkowy. Prezentowana metoda jest dwustopniowa, przy czym w pierwszym stopniu przygotowania inokulum stosowana jest eza szczepu na 25-50 cm³ podłoża (czas inkubacji 40-48 h), zaś w drugim stopniu przygotowania inokulum, pożywką z utworzoną na niej błoną, po intensywnym zmieszaniu, zaszczepia się podłoże (5-10% wag. zawiesiny na 200-300 cm³ podłoża; czas inkubacji 40-48 h), a uzyskanym inokulum, po dokładnym zmieszaniu, zaszczepia się odpowiednio spreparowane podłoże hodowlane. Zastosowanie tej metody pozwala na uzyskanie wysokokrystalicznej α -celulozy bakteryjnej w postaci folii o grubości 0,01-0,5 mm, o czystości wynoszącej ~97%, o stopniu polimeryzacji 2000-6000 oraz cechującej się wysoką jednorodnością i gęstością powierzchniową (22-24 g·m⁻²).

W opisie patentowym PL 190961 przedstawiono sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej na drodze hodowli bakterii octowych na podłożu płynnym opartym na glukozie i jej pochodnych, pozwalający na wytworzenie polimeru o kontrolowanej, założonej charakterystyce cząsteczkowej, nadcząsteczkowej i morfologicznej oraz kontrolowanym wbudowaniu merów N-acetyloglukozoaminy

w jego łańcuchy. Opisana metoda pozwala na uzyskanie α -celulozy z zastosowaniem metody statycznej (czystość >92%; wydajność 3 g·dm⁻³) i dynamicznej (czystość >88%; wydajność 1,2 g·dm⁻³).

Z opisu patentowego PL 212003 znany jest sposób otrzymywania celulozy bakteryjnej w warunkach hodowli stacjonarnej z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum*. Przed właściwą hodowlą produkcyjną stosuje się wstępną preinkubację całej objętości podłoża w warunkach stacjonarnych w czasie 24 h w temperaturze 27-33°C, po czym po dokładnym wymieszaniu podłoża i przelaniu do bioreaktorów w takich ilościach, aby stosunek powierzchni do objętości wynosił 0,6-0,8 cm⁻¹, prowadzi się hodowlę produkcyjną właściwą w warunkach stacjonarnych w czasie 5-7 dni.

Z opisu patentowego PL 216180 znany jest sposób wytwarzania bionanocelulozy o właściwościach opatrunku na uszkodzenia skóry, przeznaczonej do zastosowania dla wyrobów medycznych i dermatologiczno-kosmetycznych w postaci czystych, wilgotnych, suszonych, liofilizowanych lub napawanych z użyciem substancji czynnych i/lub pomocniczych lub ich kombinacji, który charakteryzuje się tym, że bionanocelulozę wytwarza się w drodze hodowli szczepu bakterii *Glucanacetobacter xylinus* E₂₅, przechowywanych w postaci liofilizatu z 5-15% odtłuszczonego mleka lub w postaci liofilizatu z 5-15% glicerolu, z których przygotowuje się inokulum starterowe do zaszczerpienia podłoża hodowlanego zawierającego: 2% glukozy, 0,90% etanolu, 0,10% kwasu cytrynowego, 0,50% ekstraktu drożdżowego oraz sole mineralne: 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,30% Na₂HPO₄. Jako pożywkę hodowlaną wykorzystuje się także ciecz pohodowlaną, oraz wodę wodociągową po myciu błon wodnym roztworem NaOH, a błony celulozowe otrzymane na podłożu z ich udziałem nadają się szczególnie na wytworzenie płatków o wysokich właściwościach adhezyjnych, jako łatwo formowalnych maseczek na twarz czy okalających inne części ciała.

W opisie patentowym PL 216702 przedstawiono sposób wytwarzania biomateriału o właściwościach chrząstki, przeznaczonego na implanty dla chirurgii rekonstrukcyjno-odtwórczej. Do tego celu zastosowano celulozę mikrobiologiczną wytworzoną w hodowli stacjonarnej bakterii *Glucanacetobacter xylinus* prowadzonej w płaskim bioreaktorze lub w rurkach polietylenowych, którą po oddzieleniu od cieczy pohodowlanej i oczyszczeniu, modeluje się w konstrukcję przestrzenną o żądanym kształcie i poddaje modyfikacji polegającej na działaniu 30% wodnym roztworem ługu

sodowego, płukaniu w wodzie destylowanej, następnie działaniu 10% wodnym roztworem kwasu octowego i powtórnym płukaniu w wodzie destylowanej, aż do uzyskania przez materiał celulozowy pH 5,6-6,8. Otrzymany materiał cechuje się dużą wytrzymałością na zrywanie i przepalenia, jest sprężysty oraz daje się modelować do dowolnego kształtu i zachowuje nadany kształt po modyfikacji, jest biokompatybilny i niealergizujący, charakteryzuje się minimalnym stopniem wchłaniania płynów ustrojowych i nie ulega resorpcji pod działaniem tych płynów.

W opisie patentowym PL 212003 opisano dwuetapowy sposób otrzymywania celulozy bakteryjnej z zastosowaniem bakterii *Acetobacter xylinum* w warunkach stacjonarnych. Przed hodowlą właściwą stosowano preinkubację całej objętości podłoża w warunkach stacjonarnych w czasie 24 h w temperaturze 27-33°C, a następnie po wymieszaniu i przelaniu do bioreaktorów przeprowadzono stacjonarną hodowlę właściwą w czasie 5-7 dni, stosując podłoże korzystnie uzupełnione karboksymetylocelulozą.

W opisie patentowym PL 214844 dotyczącym modyfikacji błon celulozowych przedstawiono wykorzystanie celulozy bakteryjnej z bakterii *Acetobacter xylinum* w procesie podzielonym na trzy etapy. Przedstawiono również sposób użycia sproszkowanej celulozy bakteryjnej w procesie kriożelowania w postaci sferycznej zawiesiny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* lub bakterii *Bacillus subtilis*.

W literaturze międzynarodowej można znaleźć wiele opisów patentowych dotyczących sposobu wytwarzania celulozy bakteryjnej o różnorodnych właściwościach z zastosowaniem wielu wariantów konstrukcyjnych bioreaktorów. W opisach patentowych US 5846213 i CA 2207988 omówiono zastosowanie bioreaktorów przepływowych w celu uzyskania celulozy bakteryjnej. W patentach US2006/1347 i WO 2004/50986 opisano dwuetapowy proces hodowli tego biomateriału zapewniający otrzymanie błony o gramaturze 10-45 g·m⁻². W opisie patentu US 2009/0017506 omówiono otrzymywanie celulozy bakteryjnej z zastosowaniem *Acetobacter xylinum* w reżimie ciągłym (bez konieczności wymiany medium hodowlanego po jednym cyklu). W tym przypadku czas fermentacji trwa 24-456 h i zapewnia gramaturę błon w zakresie 6-240 g·m⁻². Z opisu patentowego US 2009/0220560 znany jest opatrunek celulozowy powlekany nanosrebrem, w celu zwiększenia właściwości bakteriobójczych biomateriału. W patencie US 7390499 otrzymywano celulozę bakteryjną w warunkach

statycznej hodowli z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum*. Celulozę hodowano w zamkniętych bioreaktorach przez 7-30 dni w temperaturze 30°C, minimalizowano skraplanie pożywki oraz dostęp tlenu. Wykazano, że stężenie tlenu ma znaczący wpływ na grubość warstwy celulozy i zawartość wody w biomateriale (optymalny poziom tlenu 5-21% na granicy faz pożywka-powietrze). Zgodnie z opisem wydajność może być zwiększona poprzez zwiększenie cukru w pożywce (~3,5 raza). Zgłoszenie patentowe WO 2007/091801 dotyczy sposobu produkcji błon celulozowych nasączonych czynnikami pomocniczymi oraz substancjami regulującymi wilgotność lub przeciwtleniającymi. Metody produkcji celulozy bakteryjnej zostały opisane również w patentach CN 101700408 (produkcja modyfikowanych, wysokokrystalicznych opatrunków hydrożelowych udziałem szczepu *Gluconacetobacter xylinus*), CN 10191626 (proces produkcji błon celulozowych z zastosowaniem tolerującego niskie pH pożywki szczepu *Gluconacetobacter sp. S.C.-01* mogącego znaleźć zastosowanie w produkcji na skalę przemysłową), CN 10168167 (proces produkcji błon celulozowych z zastosowaniem tolerującego niskie temperatury szczepu *Gluconacetobacter xylinus* 323). Sposoby syntezy celulozy bakteryjnej są podane również w następujących opisach patentowych: US 5975095, US 5962278, US 6110712, US 6429002, US 6329192, US 5144021, US 5079162, US 4863565, US 5955325, US 4788146, US 4588400, EP 0792935, WO 8602095.

W europejskim zgłoszeniu patentowym EP 0197748 i patencie US 4891317 opisano sposób biosyntezy celulozy bakteryjnej w obecności stacjonarnego pola magnetycznego 0,5 Gaussa ($5 \cdot 10^{-5}$ Tesli). W przypadku celulozy otrzymywanej przez mikroorganizmy prokariotyczne, w obecności zastosowanego pola magnetycznego, otrzymany biomateriał wykazuje większą absorpcję wody i większą reaktywność chemiczną. Dodatkowym efektem wpływu tego typu pola jest bardziej jednorodne rozprowadzenie składników odżywczych w pożywce. Pod działaniem zewnętrznie przyłożonego stacjonarnego pola magnetycznego na komórki eukariotyczne (tkanka roślinna), generuje się zmiany mikrofibryli celulozy. Występujące nieuporządkowanie w strukturze mikrofibryli może wpływać znacząco na własności mechaniczne i fizyczne biomateriału.

W wyniku zastosowania opisanych powyżej procedur syntezy celulozy bakteryjnej otrzymuje się produkt w postaci materiału cechującego się regularną,

liniową i rozgałęzioną strukturą. Obecnie istnieje wiele metod modyfikacji celulozy bakteryjnej, które można podzielić na trzy główne grupy: i) manipulacje genetyczne dokonywane na szczepach referencyjnych; ii) zastosowanie odpowiednich warunków podczas procesu produkcji celulozy bakteryjnej polegających na optymalizowaniu pożywki hodowlanej, warunków hodowli materii ożywionej, czasu produkcji; iii) modyfikacje otrzymanego produktu poprzez zastosowanie czynników chemicznych i/lub enzymatycznych. Pomimo szeregu opatentowanych sposobów produkcji celulozy bakteryjnej istnieje konieczność ciągłej optymalizacji metod otrzymywania tego materiału. Z praktycznego punktu widzenia proponowane procedury są mało efektywne ze względu na aspekt ekonomiczny oraz skalę produkcji.

Uwzględniając powyższe spostrzeżenia, celem jest opracowanie sposobu do intensyfikacji procesu produkcji celulozy bakteryjnej o zwiększonej absorpcji wody, wpisującej się w drugą grupę wyżej wymienionych sposobów wpływania na proces biosyntezy celulozy z zastosowaniem odpowiednich szczepów mikroorganizmów.

Sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej, według wynalazku polega na tym, że w pierwszym etapie, przygotowuje się znaną metodą inokulum. W tym celu na podłożu Herstin-Schramm zawierającym glukozę (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na_2HPO_4 (0,27 w/v%), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05 w/v%), wysterylizowanym oraz wzbogacanym alkoholem etylowym (1 v/v%), zaszczepia się bakterie *Gluconacetobacter xylinus*, przechowywane na stałym podłożu o składzie: glukoza (2w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na_2HPO_4 (0,27 w/v%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2w/v%), wysterylizowanym i wzbogacanym alkoholem etylowym (1 v/v%). Następnie przygotowaną hodowlę mikroorganizmów miesza się przez 15 minut i inkubuje przez 7 dni w temperaturze 28-30°C. po czym ponownie miesza się przez 5 minut. Tak otrzymanym inokulum zaszczepia się na świeże podłoże Herstin-Schramm o takim samym składzie jak podano powyżej, w celu hodowli produkcyjnej.

Istotą wynalazku jest to, że hodowlę produkcyjną prowadzi się w obecności wirującego pola magnetycznego o częstotliwości wirowania w zakresie 10-50 Hz, indukcji magnetycznej w zakresie 5-35 mT, przez 3 dni, przy pH w zakresie 4,5-5,5, w temperaturze 28-30°C. W kolejnym etapie, uzyskane błony celulozowe

przenosi się do czystych pojemników, przemywa wodą destylowaną, a następnie oczyszcza poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze 90°C przez 30 minut. Procedura oczyszczania powtarzana jest trzykrotnie. Oczyszczona celuloza płukana jest w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5-7,5 i suszona w 60°C do momentu uzyskania stałej wagi.

Sposób produkcji celulozy bakteryjnej, według wynalazku dzięki zastosowaniu wirującego pola magnetycznego pozwala na polepszenie warunków i stabilności hodowli szczepu *Gluconacetobacter xylinus* oraz otrzymanie powtarzalnego biomateriału o wyróżniającej się jakości i zadawalającej wydajności. Dodatkowym efektem wpływu wirującego pola magnetycznego jest uzyskanie produktu o zwiększonej absorpcji wody w postaci elastycznej membrany na powierzchni ciekłej pożywki. Uzyskany materiał ma mniejszą gęstość oraz mniejsze usieciovanie mikrofibryl celulozowych w porównaniu do próbek niepoddawanych oddziaływaniom wirującego pola magnetycznego.

Sposób według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania na rysunku, na którym fig. 1 i fig.2 przedstawiają błony celulozowe uzyskane po 3 dniowej hodowli, przy czym fig.1 przedstawia hodowlę prowadzoną w obecności wirującego pola magnetycznego, fig.2 hodowlę kontrolną, prowadzoną w stacjonarnych warunkach (błone celulozową w obu przypadkach wskazano strzałkami); fig. 3 i 4 przedstawiają zdjęcie otrzymanego biomateriału wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego, przy czym fig.3 przedstawia hodowlę prowadzoną w obecności wirującego pola magnetycznego, fig.4 hodowlę kontrolną, prowadzoną w stacjonarnych warunkach.

Przykład 1

Przygotowano inokulum. W tym celu na podłożu Herstin-Schramm zaszczerpiono bakterie *Gluconacetobacter xylinus*. Podłoże Herstin-Schramm zawierało: glukozę (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·H₂O (0,05 w/v%) Podłoże było wysterylizowane oraz wzbogacone alkoholem etylowym (1 v/v%). Bakterie *Gluconacetobacter xylinus*, przechowywane były na stałym podłożu o składzie: glukoza (2w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·7H₂O (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2w/v%), również wysterylizowanym i wzbogaconym alkoholem

etylowym (1 v/v%). Po zaszczepieniu bakterii hodowlę mieszano na wytrząsarce laboratoryjnej przez 15 minut i inkubowano przez kolejne 7 dni w temperaturze 28-30°C. Po 7 dniach inkubacji uzyskaną hodowlę ponownie miesza się na wytrząsarce typu worteks przez 5 minut. Otrzymane w ten sposób inokulum przenosi się na świeże podłoże Herstin-Schramm o takim samym składzie jak podano powyżej, miesza się przez 5 minut i prowadzi się hodowlę produkcyjną z udziałem wirującego pola magnetycznego o częstotliwości wirowania 50 Hz, indukcji magnetycznej 35 mT. Hodowlę prowadzi się przez 3 dni w temperaturze 28-30°C utrzymując pH w zakresie 4,5-5,5.

Otrzymane błony celulozowe przenosi się do czystych pojemników, przemywa się wodą destylowaną, a następnie oczyszcza się poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze 90°C przez 30 minut. Procedurę oczyszczania powtarza się trzykrotnie, następnie oczyszczoną celulozę płucze się w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5-7,5 i suszy się w 60°C do momentu uzyskania stałej wagi.

Dla uzyskanego biomateriału wyznacza się wskaźnik pęcznienia WP , zgodnie z metodą podaną w czasopiśmie International Journal of Pharmaceutics, 156 (2), 24 październik 1997, strony 229–237 i według następującej zależności:

$$WP = \frac{G_1 - G_0}{G_0} 100\%$$

gdzie: G_1 – masa otrzymanej biocelulozy bakteryjnej po całkowitym wysyceniu wodą (w stanie maksymalnego spęcznienia); G_0 – masa celulozy po całkowitym wysuszeniu.

Podany wskaźnik WP wyznacza się dla biocelulozy bakteryjnej otrzymanej w procesie produkcyjnym wspomaganym zastosowaniem wirującego pola magnetycznego oraz dla biocelulozy bakteryjnej uzyskiwanej w próbach kontrolnych.

Dla procesu produkcji celulozy bakteryjnej przy udziale wirującego pola magnetycznego uzyskiwano wskaźnik WP w zakresie 2300-2400%. Dla porównania wskaźnik pęcznienia obliczony dla celulozy uzyskanej z hodowli prowadzonych w ten sam sposób, ale bez ekspozycji na wirujące pole magnetyczne wynosił o 1800-1900%. Obliczony z poniższej zależności względny współczynnik pęcznienia

$$WP_{wzgl\u0119dny} = \frac{WP_{pole} - WP_{kontrola}}{WP_{kontrola}} 100\%$$

wyказuje, że zmienia się on w zakresie 24-28%. Świadczy to o pozytywnym wpływie wirującego pola magnetycznego na proces produkcji biomateriału charakteryzującego się zwiększoną chłonnością wody (max. 28%) w porównaniu z biosyntezą prowadzoną bez zastosowania tego typu oddziaływania.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że hodowlę produkcyjną prowadzi się w obecności wirującego pola magnetycznego o częstotliwości wirowania 25 Hz, indukcji magnetycznej 28 mT. Hodowlę prowadzi się przez 3 dni w temperaturze 28-30°C utrzymując pH w zakresie 4,5-5,5. Dla podanych warunków prowadzenia procesu otrzymano celulozę bakteryjną charakteryzującą się wskaźnikiem *WP* w zakresie 2100-2200%. Względny współczynnik pęcznienia zmienia się w zakresie 15-20%.

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że hodowlę produkcyjną prowadzi się w obecności wirującego pola magnetycznego o częstotliwości wirowania 10 Hz, indukcji magnetycznej 5 mT. Hodowlę prowadzi się przez 3 dni w temperaturze 28-30°C utrzymując pH w zakresie 4,5-5,5. Dla podanych warunków prowadzenia procesu otrzymano celulozę bakteryjną charakteryzującą się wskaźnikiem *WP* w przybliżeniu równym 2000%. Względny współczynnik pęcznienia zmienia się w zakresie 5-10%.