

Sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej o znacznych właściwościach sorpcyjnych

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania modyfikowanej *ex situ* celulozy bakteryjnej o znacznych właściwościach sorpcyjnych, otrzymanej w warunkach hodowli stacjonarnej z wykorzystaniem szczepu z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter xylinus* (dawniej *Gluconacetobacter xylinus* i *Acetobacter xylinum*). Celuloza może znaleźć zastosowanie w medycynie jako materiał opatrunkowy lub nośnik dla substancji bioaktywnych w terapii zakażonych, przewlekłych i trudno gojących się ran.

Celuloza bakteryjna (CB), podobnie jak roślinna jest polisacharydem zbudowanym z jednostek β ,D-glukopiranozy połączonych ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. CB, w przeciwieństwie do celulozy roślinnej należy do wysokokrystalicznych celuloz, bogatych we frakcję Ia. Jest ona biopolimerem produkowanym przez tlenowe Gram-ujemne bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Proces wytwarzania tego materiału przez komórki drobnoustroju można podzielić na dwa etapy. Etap pierwszy polega na polimeryzacji cząsteczek glukozy w liniowy β -1,4-glukan, natomiast etap drugi - na łączeniu i krystalizacji indywidualnych łańcuchów polimerowych w większe struktury.

Wykorzystanie CB w medycynie, szczególnie jako materiału opatrunkowego oraz sztucznych organów, jest możliwe dzięki takim jej właściwościom jak wysoka czystość, wytrzymałość mechaniczna, zdolność chłonięcia cieczy, bardzo dobra zgodność z żywą tkanką, a w szczególności z krwią. Ponadto materiał uzyskiwany z CB jest biokompatybilny, porowaty, elastyczny, w pełni biodegradowalny, łatwy w zastosowaniu i przechowywaniu, zapewnia optymalną wilgotność sprzyjającą gojeniu się ran i może być sterylizowany termicznie. Właściwie oczyszczone błony celulozowe, wytworzone metodą hodowli stacjonarnej, mogą stanowić materiał opatrunkowy spełniający standardy przypisane nowoczesnym opatrunkom. Błony celulozowe są również bardzo dobrymi nośnikami służącymi do immobilizacji różnorodnych substancji

bioaktywnych, przyspieszających proces gojenia lub o charakterze przeciwdrobnoustrojowym.

Struktura produkowanej CB jest uzależniona od indywidualnych cech mikroorganizmu, chociaż jej właściwości takie jak elastyczność, zawartość wody, stopień polimeryzacji i krystalizacji w największym stopniu zależą od warunków hodowli, czasu jej trwania i składu stosowanego podłoża (różne źródła węgla i azotu). Parametry końcowe produktu decydują o możliwościach jego zastosowania w medycynie, kosmetyce, papiernictwie, elektronice, akustyce i przemyśle spożywczym.

Przemysłowy proces biosyntezy CB prowadzony jest najczęściej w warunkach hodowli stacjonarnej lub mieszanej/wytrząsanej. Wybór metody hodowli zależy ściśle od dalszego przeznaczenia syntetyzowanego polimeru. W przypadku prowadzenia hodowli w warunkach statycznych wytwarzany przez bakterie *K. xylinus* polisacharyd syntezowany jest w postaci silnie uwodnionej (zawartość wody ok. 95 - 98%) i elastycznej membrany na powierzchni pożywki. Uzyskany w ten sposób materiał posiada specyficzną nanostrukturę, cechującą się mniejszym przekrojem poprzecznym włókien, wysokim stopniem krystaliczności (>60%), brakiem zanieczyszczeń charakterystycznych dla celulozy roślinnej (np. hemicelulozy i ligniny), biofunkcjonalnością oraz hipoalergiczną. Materiał na bazie CB można poddać suszeniu w celu usunięcia wody, co znacznie zwiększa jego trwałość wydłużając możliwy czas przechowywania produktu oraz zwiększa możliwości jego wykorzystania, niestety konsekwencją tego procesu jest znaczny spadek zdolności do jego ponownego uwodnienia. Związane jest to z nieodwracalnymi zmianami w mikrostrukturze CB jakie zachodzą podczas usuwania wody z przestrzeni między fibrylami celulozowymi (fibryle zapadają się, nieodwracalnie tracąc swoją strukturę przestrzenną).

Poza hodowlą stacjonarną CB można również produkować w różnego typu aparatach i urządzeniach. Regulując warunki procesowe można otrzymać produkt o pożądanym własnościach fizykochemicznych i mechanicznych. Biosyntezę CB można realizować w aparatach wyposażonych w mieszadło mechaniczne (Cheng et al., 2011, *Biomacromolecules* 12(3):730-736) lub w kolumnach typu *air-lift* (Zuo et al. 2006, *Biochem. Eng. J.* 29(1-2):81-90), w których cyrkulacja medium hodowlanego wywołana jest poprzez wprowadzenie do płynu strumienia gazu (powietrza). Wynikiem

przewodzenia procesu w warunkach dynamicznych jest otrzymanie CB w postaci nieregularnych struktur.

Poza zastosowaniem odpowiednich warunków hodowlanych podczas procesu produkcji CB, istnieje wiele innych metod modyfikacji CB, w tym np. manipulacje genetyczne bakterii wytwarzających CB lub modyfikacje wytworzonej CB poprzez zastosowanie czynników chemicznych i/lub enzymatycznych.

Sposoby biosyntezy, modyfikacji oraz zastosowania CB opisane są w licznych zgłoszeniach patentowych.

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 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 CB w warunkach hodowli stacjonarnej z zastosowaniem szczepu *A. 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.

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 *Gluconacetobacter 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 powtórny płukaniu w wodzie destylowanej, aż do uzyskania przez materiał celulozowy pH 5,6-6,8. Otrzymany materiał cechuje się dużą wytrzymałością na zrywanie i przepalenie, 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 227860 przedstawiono sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej, który 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%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·H₂O (0,05 w/v%), wysterylizowanym oraz wzbogacanym alkoholem etylowym (1 v/v%), zaszczenia 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%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·7H₂O (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2w/v%), wysterylizowanym i wzbogaconym 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 zaszczenia 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.

Ze zgłoszenia patentowego P.415673 znany jest również sposób wytwarzania celulozy polegający na przygotowaniu inokulum z wykorzystaniem bakterii *Gluconacetobacter xylinus*, który charakteryzuje się tym, że wraz z bakterią *Gluconacetobacter xylinus* na podłoże Herstina-Schramma zaszczenia się zawiesiną bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactbacillus* o gęstości 0,5° McFerland (1,5·10⁸ CFU/mL). Stosuje się zawiesiną bakterii *Lactbacillus* otrzymaną z 24h hodowli prowadzonej w płynnym podłożu MRS (deMan,

Rogosa and Sharpe). Bakterie te oddziela się od podłoża poprzez odwirowanie z prędkością 3000 obr/min przez 15 min, a następnie inkubuje w buforze fosforanowym (PBS), w celu otrzymania zawiesiny komórek o określonej gęstości. Stosunek objętościowy bakterii *G. xylinus* i mikroorganizmów probiotycznych z rodzaju *Lactbacillus* wynosi 1 do 100. Hodowlę tych bakterii można prowadzić metodą stacjonarną lub wytrząsaną przez okres 6 dni, utrzymując temperaturę w zakresie 28-30°C.

Z opisu EP 0200409 znany jest sposób wytwarzania CB przez szczepy z rodzaju *Acetobacter*, *Pseudomonas* i inne, metodą stacjonarną w temperaturze 20 - 40°C w czasie od 1 - 20 dni, przy pH = 3 - 9, przy zastosowaniu jako źródła węgla w podłożu glukozy, sacharozy, maltozy czy skrobi. Otrzymany w ten sposób biomateriał charakteryzuje się wysokim modulem sprężystości i posiada praktyczne zastosowanie w elektronice.

Znane są również z publikacji międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr WO 86/02095, patentu japońskiego nr A-120 159/85 i patentu brytyjskiego nr 2,131,701 sposoby wytwarzania CB na drodze hodowli statycznej i dynamicznej z wykorzystywaniem bakterii *Acetobacter xylinum* w temperaturze 20 – 28°C w czasie od kilku godzin do kilkunastu dni na podłożu hodowlanym zawierającym fruktozę, glukozę, sorbitol lub mannitol jako źródło węgla. Otrzymana CB charakteryzuje się właściwościami umożliwiającymi zastosowanie tego polimeru jako opatrunku medycznego lub sztucznej skóry.

W opisach patentowych US 2006/1347 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 CB 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 znana jest metoda wytwarzania opatrunku celulozowego powlekanego nanosrebrem, nadająca polimerowi właściwości przeciwbakteryjne. W badaniach, których wyniki opublikowano w patencie US 7390499 otrzymywano CB w warunkach statycznej hodowli z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum* i 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). Zgłoszenie patentowe WO 2007/091801 dotyczy sposobu produkcji błon celulozowych nasączonych czynnikami pomocniczymi oraz substancjami regulującymi wilgotność lub przeciwutleniającymi. Metody produkcji CB 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).

W opisie patentowym JP 54041321 przedstawiony jest sposób otrzymywania opatrunku na choroby skórne, o właściwościach zapewniających wysoki stopień miejscowego przylegania i długotrwałe działanie, z wykorzystaniem hydroksypropylocelulozy, kwasu poliakrylowego lub jego soli oraz ich składnika aktywnego. Z opisu patentowego US 7390499 B2 znany jest sposób otrzymywania celulozy mikrobiologicznej w warunkach statycznej hodowli z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum* charakteryzującej się zdolnością do oddawania nadmiaru płynów na rzecz stopniowego wysychania, ale i do pobierania nadmiaru płynu po wyschnięciu, a tym samym znajdującej zastosowanie do produkcji opatrunków przeznaczonych do leczenia ran przewlekłych, owrzodzeniowych, odleżynowych i stopy cukrzycowej.

Z opisu patentowego WO 2007/091801 wynika, iż uzyskana celuloza poddawana jest procesowi 1 - 2 dniowego nasączania substancjami pomocniczymi, aktywnymi substancjami leczniczymi lub preparatami kosmetycznymi. Maty otrzymanej CB wykazują zdolność do łagodzenia uszkodzeń i podrażnień skórnych, w szczególności mogą być stosowane na rany oparzeniowe. CB może być aplikowana w formie czystej membrany lub nasączonej substancjami aktywnymi, substancjami regulującymi wilgotność, wspomagającymi leczenie ran, czy substancjami przeciwutleniającymi. Gotowa kompozycja opatrunku stanowi 1 - 50% wagowych celulozy bakteryjnej, 1 - 10% wagowych substancji czynnych, 40 - 98% wagowych wody.

Z opisów patentowych US 5846213, CA 2207988 znany jest sposób wytwarzania CB w bioreaktorach o stałym przepływie. Zgodnie z treścią patentu, otrzymaną masę

celulozową poddaje się działaniu dimetyloacetamidu i chlorku litu, a z uzyskanego roztworu odlewa się płaską błonę i wprowadza ją do kąpeli żelującej pozwalającej na uzyskanie materiału o pożądanych właściwościach chłonnych.

Pomimo opisanych powyżej sposobów otrzymywania CB i możliwych aplikacji tego unikalnego biomateriału jako opatrunków lub nośników dla substancji bioaktywnych, istnieje ciągła potrzeba doskonalenia jego właściwości w celu zwiększenia możliwości jego zastosowania w specyficznych aplikacjach medycznych i biotechnologicznych. Związane jest to z faktem, iż istniejące metody i technologie ciągle nie pozwalają osiągnąć maksymalnych, a często nawet wystarczających parametrów jakie można uzyskać w przypadku biomateriałów na bazie CB.

Jednym ze sposobów, pozwalających na modyfikację biopolimerów, w tym celulozy, w celu poprawy ich właściwości fizycznych jest reakcja krzyżowego sieciowania stanowiąca jedną z możliwych metod chemicznej modyfikacji struktury polimerów. Polega ona na łączeniu kolejnych łańcuchów polimeru za pomocą czynnika mostkującego, w celu promowania zmiany właściwości fizycznych tych materiałów. Tworzenie się połączeń krzyżowych może być inicjowane przez wysoką temperaturę, ciśnienie, zmianę pH, lub napromieniowanie. Gdy łańcuchy polimerowe są usieciowane, materiał staje się bardziej sztywny. Reakcja krzyżowego sieciowania polimerów jest szeroko opisana w publikacjach oraz opisach patentowych.

W literaturze opisano również różne sposoby wytwarzania zindywidualizowanych, usieciowanych włókien celulozowych, czyli takich, które mają wiązania sieciujące głównie wewnątrz włókien (między cząsteczkami celulozy pojedynczego włókna), a nie między cząsteczkami celulozy oddzielnych włókien. Takie zindywidualizowane, usieciowane włókna są użyteczne w zastosowaniach związanych z wyrobami chłonnymi. Oprócz zwiększonych możliwości absorpcyjnych, usieciowana celuloza wykazuje zwykle zwiększoną sprężystość.

Sposób wytwarzania usieciowanych włókien celulozy roślinnej za pomocą impregnacji w roztworze wodnym ujawniono między innymi w opisie patentowym US 3241553. Opis ten ukazuje również korzyści wynikające z przeprowadzania reakcji sieciowania na mokro w porównaniu z sieciowaniem na sucho. Roztwór wodny zawierał środek sieciujący i katalizator, przyspieszający reakcję tworzenia się wiązań między czynnikiem mostkującym (sieciującym) a cząsteczkami celulozy. Usieciowane w ten

sposób włókna charakteryzowały się wyższą elastycznością niż włókna usieciowane na sucho, większymi możliwościami retencji płynów, oraz wyższą chłonnością. Usieciowana według wynalazku celuloza roślinna jest użyteczna w tworzeniu kompozytów absorpcyjnych. Kluczową rolę w procesie chemicznego sieciowania odgrywa czynnik mostkujący. Opisano już wiele substancji dających możliwość usieciowania polimeru. Jednymi z pierwszych takich środków były formaldehyd i produkty mocznikowo-formaldehydowe. Ich działanie przedstawiono w opisach patentowych US 2764573, US 3112156, US 3224926, US 241553, US 260565, US 3756913, US 3932209, US 4035147, US 5225047. Mimo skuteczności tych środków, istnieje problem z bezpieczeństwem ich stosowania, co sprawiło, że poszukuje się innych, bezpiecznych substancji będących w stanie efektywnie reagować z polimerami, pozwalając na uzyskanie pożądanego produktu. W świetle tej potrzeby pojawiło się wiele nowych środków sieciujących dla włókien celulozowych. Grupę szeroko stosowaną jako środki sieciujące stanowią substancje posiadające grupy wielofunkcyjne, takie jak grupy karboksylowe lub aldehydowe. Przykładowo, kwasy alkanopolikarboksylowe są zdolne do sieciowania włókien celulozowych przez tworzenie wiązań estrowych z grupami hydroksylowymi celulozy. Sieciowanie może nastąpić po podgrzaniu celulozy w mieszaninie kwasu alkanopolikarboksylowego i katalizatora takiego jak podfosforyn sodu, w temperaturze powyżej 165°C, co opisano między innymi w patentach US 4820307, US 4936865, US 5042986, US 137537, US 273549, oraz w patencie europejskim nr. 0427316 B1. Również dialdehydy (na przykład glioksal) są zdolne do sieciowania grup hydroksylowych celulozy za pomocą wiązań acetalowych (patenty US 4472167, US 4822453, US 4889595, US 6207278 B1). W opisie patentowym CA 2028977C ujawniono, że korzystnymi środkami sieciującymi w przypadku otrzymywania wysokochłonnych materiałów do zastosowań medycznych są nasycone kwasy polikarboksylowe o liczbie atomów węgla 2-9, które zawierają co najmniej trzy grupy karboksylowe na cząsteczkę. Jednym z takich środków jest kwas cytrynowy, który jest szczególnie korzystny ze względu na fakt, iż jest on bezpieczny i niedrażniący dla ludzkiej skóry, oraz wykazuje trwałe wiązania sieciujące. Ponadto jest on szeroko dostępny w stosunkowo niskich cenach, dzięki czemu jest możliwe jego komercyjne wykorzystanie.

W patencie US 7974301 B2 wyróżnione są natomiast katalizatory przyspieszające tworzenie wiązania estrowego między grupami hydroksylowymi celulozy i kwaśnymi grupami aldehydowymi środka sieciującego. Substancje opisane jako nadające się do zastosowania jako katalizatory w reakcji sieciowania obejmują chlorek cynku, azotan cynku, chlorek amonu, siarczan amonu, chlorek magnezu, octan magnezu, siarczan glinu, podfosforyn sodu, fosforyn sodu, oraz ich mieszaniny. Odpowiedni stosunek wagowy katalizatora do aldehydu kwasowego wynosi na przykład od 1:1 do 1:10, korzystnie od 1:2 do 1:6.

Jak dotąd reakcje sieciowania wykorzystywano w celu modyfikacji wielu polimerów, co przedstawiono na powyższych przykładach, w tym na bazie celulozy roślinnej, przy czym, poza jedną publikacją naukową (Meftahi, A., Khajavi, R., Rashidi, A., Rahimi, M. K., & Bahador, A., 2018, Preventing the collapse of 3D bacterial cellulose network via citric acid. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(3), 311-320), nie ma żadnych innych doniesień odnośnie możliwości wykorzystania tego sposobu do modyfikowania właściwości celulozy bakteryjnej. W powyższej pracy wykorzystano kwas cytrynowy, jako substancje sieciującą oraz podfosforyn sodu jako katalizator (jest to najczęściej wykorzystywany i opisywany jako najefektywniejszy katalizator w reakcjach sieciowania celulozy roślinnej z użyciem kwasu cytrynowego). Jak podają autorzy pracy, dzięki zastosowaniu metody możliwe jest uzyskanie CB charakteryzującej się następującymi właściwościami: znacznie zwiększonymi zdolnościami sorpcyjnymi, wyższą porowatością i zwilżalnością w porównaniu z próbką CB nietraktowaną roztworem sieciującym. Mimo, że podfosforyn sodu nie wykazuje toksycznego działania jak to jest w przypadku wyżej wspomnianego formaldehydu, to jednak w wyniku termicznego rozkładu tej substancji powstaje fosforowodór, który jest silnie toksycznym i skrajnie łatwopalnym gazem. Ponadto podfosforyn sodu może wywierać negatywny wpływ na środowisko, ponieważ ługowane związki wodorofosforu przedostają się do wód powierzchniowych (Feng, X., Xiao, Z., Sui, S., Wang, Q., & Xie, Y. (2014). Esterification of wood with citric acid: The catalytic effects of sodium hypophosphite (SHP). *Holzforschung*, 68(4), 427-433.).

Z tego powodu wydaje się być uzasadnionym, że w biomateriałach szczególnie kojarzonych z zagadnieniami proekologicznymi jakim są materiały oparte o CB należy zwrócić szczególną uwagę na maksymalne ograniczenie substancji, które mogłyby

wykazywać negatywne oddziaływanie na środowisko. Jednocześnie warto zadbać o aspekt ekonomiczny procesu przemysłowego wytwarzania wszelkich produktów do takich zastosowań.

Sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej, według wynalazku, polega na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczepienie na podłożu płynnym Hestrin-Schramm zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter xylinus* (dawniej *Gluconacetobacter xylinus*), następnie wymieszaniu przez 15 minut i inkubowaniu przez 7 dni w temperaturze 25 - 30°C, ponownym wymieszaniu przez 5 minut, i przeniesieniu tak otrzymanego inokulum w ilości 5 - 20% objętościowych do podłoża produkcyjnego i prowadzeniu hodowli stacjonarnej przez 4 - 20 dni w temperaturze 25 - 30°C. Następnie na oczyszczaniu za pomocą 0,1 M roztworu NaOH w 80°C przez 30 min i przepłukiwaniu wodą destylowaną do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5 - 7,5, po czym celulozę bakteryjną po oczyszczeniu inkubuje się przez 24 godziny w mieszaninie 20% roztworu kwasu cytrynowego i poddaje sieciowaniu w obecności katalizatora. Istota wynalazku polega na tym, że reakcję krzyżowego sieciowania prowadzi się w obecności 5 - 15% roztworu wodorofosforanu disodu i/lub wodorowęglanu sodu jako katalizatora, w stosunku wagowym kwasu cytrynowego do katalizatora od 1:1 do 6:1, w temperaturze 120 - 200°C, a po reakcji sieciowania, w celu odpłukania niezwiązanych cząsteczek kwasu cytrynowego oraz katalizatora, celulozę bakteryjną przepłukuje się wodą destylowaną do uzyskania pH w przedziale 6,5 - 7,5.

Korzystnie stosuje się mieszaninę roztworu wodorofosforanu disodu i roztworu wodorowęglanu sodu w stosunku wagowym 1:1.

Korzystnie otrzymaną modyfikowaną celulozę bakteryjną poddaje się w czasie od 1 - 24 godzin wysycaniu w mieszalniku, w roztworze substancji czynnych i/lub pomocniczych o działaniu leczniczym, wspomagającym leczenie, lub pielęgnacyjnym oraz ich mieszanin, na przykład: antybiotyki, antyseptyki, chemioterapeutyki, substancje o działaniu przeciwzapalnym, substancje pochodzenia naturalnego (ekstrakty z roślin), związki z grupy witamin, lipidów, enzymów, a także substancje regulujące poziom nawilżenia.

Korzystnie otrzymaną modyfikowaną celulozę bakteryjną poddaje się przez 24 godziny wysycaniu w 1-10% roztworze glicerolu rozgrzanego do temperatury 80°C, a następnie suszy się tak uzyskany materiał w temperaturze pokojowej.

Korzystnie po wysycaniu roztworem glicerolu otrzymany materiał poddaje się wysycaniu w czasie od 1 - 24 godzin, w mieszalniku w roztworze substancji czynnych i/lub pomocniczych o działaniu leczniczym, wspomagającym leczenie, lub pielęgnacyjnym oraz ich mieszanin, takich jak wskazano powyżej.

Sposób produkcji biomateriałów nanocelulozowych według wynalazku, dzięki zastosowaniu odpowiednich katalizatorów umożliwiających wydajne sieciowanie włókien celulozy bakteryjnej pozwala na polepszenie właściwości CB w stanie suchym i otrzymanie powtarzalnego biomateriału o wyróżniającej się jakości. Chemicznie modyfikowana poprzez reakcję krzyżowego sieciowania CB, z zastosowaniem katalizatorów według wynalazku, posiada właściwości, które ukierunkowują jej zastosowanie w medycynie, lub kosmetyce, jako wysokochłonne materiały o dowolnym kształcie i kompozycji: w formie czystej lub jako nośniki wysycane różnego rodzaju substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwzapalnym, nawilżającym lub łagodzącym. Tak modyfikowane błony CB mogą być szczególnie przydatne do przygotowania opatrunków znajdujących zastosowanie w leczeniu rozległych, trudno gojących się ran oraz łagodzeniu uszkodzeń skóry po zabiegach leczniczych oraz dermatologiczno-kosmetycznych. Opatrunki takie mogą znaleźć również zastosowanie w leczeniu ran wysokowysiękowych, gdyż są w stanie pochłaniać przez długi okres czasu duże ilości substancji płynnych (np. wysięk z rany). Ponadto efektem sposobu według wynalazku jest znaczne, nieopisywane wcześniej w literaturze, zwiększenie chłonności (w tym wody i innych substancji płynnych na bazie wody) CB modyfikowanej w porównaniu do CB natywnej (niemodyfikowanej, nie poddawanej reakcji sieciowania). Zastosowanie procesu sieciowania i odpowiednich katalizatorów, zgodnie z opisaną procedurą, umożliwi uzyskanie CB charakteryzującej się zdolnością do długotrwałego, znacznie dłuższego w porównaniu do celulozy niemodyfikowanej, uwalniania pochłoniętych substancji. Korzyścią z zastosowania metody według wynalazku jest uzyskanie modyfikowanej CB, która dzięki usztywnieniu włókien za pomocą wiązań z kwasem cytrynowym i promowaniu tej reakcji przez katalizatory, które dodatkowo rozkładają się w wysokiej temperaturze z wydzieleniem nietoksycznych gazów mających

również wpływ na strukturę CB, zachowuje trójwymiarową strukturę nawet w stanie suchym, a jej ponowne uwodnienie zachodzi z wysoką wydajnością. W przypadku celulozy niepoddawanej reakcji sieciowania (CB niemodyfikowana) podczas jej suszenia dochodzi do zniszczenia (zapadania się) jej struktury trójwymiarowej, co powoduje znaczne pogorszenie jej zdolności do rehydratacji i do pochłaniania substancji płynnych. Sucha CB modyfikowana według wynalazku charakteryzuje się również niższą gęstością w porównaniu do suchej celulozy niemodyfikowanej (w wyniku wytworzenia się przestrzeni pomiędzy jej włóknami), a także lepszym utrzymywaniem płynów wewnątrz jej struktury (wyższy współczynnik utrzymywania cieczy, oraz wyższy współczynnik retencji). Ponadto, uzyskany materiał jest bezpieczny co oznacza, że nie wykazuje on efektu cytotoksycznego względem hodowli komórek *in vitro*. Poprawa wszystkich wymienionych właściwości fizykochemicznych wynika bezpośrednio z zastosowania mieszaniny sieciującej (kwas cytrynowy i odpowiedni katalizator) oraz procedury modyfikacji według opisu wynalazku.

Korzystnie (ze względu na opisane powyżej właściwości) błony modyfikowanej CB można poddawać nasączeniu (wysycaniu, impregnacji) w mieszalniku (np. inkubatorze z mieszaniem lub mieszalniku bębnowym) w roztworze substancji czynnych i/lub pomocniczych o działaniu leczniczym, wspomagającym leczenie, lub pielęgnacyjnym oraz ich kombinacji.

Sposób według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym fig.1 przedstawia zdjęcia CB modyfikowanej w wariacie z mieszaniną katalizatorów (zdjęcie A) oraz niemodyfikowanej (zdjęcie B), fig.2 przedstawia zdjęcia CB niemodyfikowanej i modyfikowanej przed i po rehydratacji, przy czym zdjęcie A i B – CB niemodyfikowana, odpowiednio: sucha i po rehydratacji, zdjęcie C i D – CB modyfikowana w wariacie z wodorofosforanem sodu, odpowiednio: sucha i po rehydratacji, zdjęcie E i F – CB modyfikowana w wariacie z wodorowęglanem sodu, odpowiednio: sucha i po rehydratacji, zdjęcie G i H – CB modyfikowana w wariacie z mieszaniną katalizatorów, odpowiednio: sucha i po rehydratacji, fig.3 przedstawia CB modyfikowaną w wariacie z mieszaniną katalizatorów (zdjęcie A) oraz w przekroju poprzecznym ukazującym przestrzenie utworzone pomiędzy kolejnymi warstwami celulozy (zdjęcie B).

Przykład 1

Przygotowano inokulum. W tym celu na podłożu H-S zaszczerpiono bakterie *K. xylinus*. Podłoże H-S 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 *K. xylinus*, przechowywane były na stałym podłożu o składzie: glukoza (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%), MgSO₄·7H₂O (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2 w/v%), również wysterylizowanym i wzbogaconym alkoholem etylowym (1 v/v%). Po zaszczerpieniu bakterii hodowlę mieszano na wytrząsarce laboratoryjnej przez 15 minut i inkubowano przez kolejne 7 dni w temperaturze 25 - 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 produkcyjne oparte na glukozie i jej pochodnych (np. medium H-S o takim samym składzie jak podano powyżej). Hodowle produkcyjne prowadzi się w pojemnikach hodowlanych o dowolnym kształcie i rozmiarze, korzystnie na tacach ze stali nierdzewnej, lub naczyniach laboratoryjnych (szklanych i plastikowych), wyposażonych w pokrywki posiadające filtry membranowe umożliwiające wymianę gazową w warunkach sterylnych (pory o średnicy 0,22 µm), w temperaturze 25 - 30°C w czasie 4 - 20 dni.

Po zakończeniu hodowli uzyskany materiał zważono na wadze analitycznej, a następnie otrzymane membrany celulozowe przenoszono do czystych pojemników i przemywano wodą destylowaną. W kolejnym etapie celulozę oczyszczono poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze 80°C przez 30 minut i ponownie ważono. Oczyszczoną celulozę płukano w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5 - 7,5.

W przypadku prób modyfikowanych, celulozę przenosi się następnie do pojemnika zawierającego mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodzi czynnik sieciujący, tj. 20% roztwór kwasu cytrynowego oraz 10% roztwór wodorofosforanu disodu (Na₂HPO₄) użyty jako katalizator. Stosunek wagowy katalizatora do kwasu cytrynowego wynosił 1:2. CB jest impregnowana w tej mieszaninie przez 24 godziny, a następnie przenoszona do suszarki laboratoryjnej i inkubowana w temp.

160°C do momentu, kiedy waga celulozy została ustabilizowana (1 - 12h, czas inkubacji zależy od masy próbki i procentowej zawartości cieczy). Przykładowo, dla próbek CB o masie 4-5g, zawierających 98-99 w/v% wody, uzyskanych z probówek o pojemności 50 ml i średnicy 3 cm czas ten wynosił 90 min. Po procesie sieciowania uzyskany materiał był przenoszony do czystych pojemników i przepłukiwany wodą destylowaną do uzyskania pH 6,5 - 7,5 (48-72h), a następnie suszony w temperaturze pokojowej do uzyskania stałej masy (48-72h) i ponownie ważony.

W przypadku niemodyfikowanych prób kontrolnych uzyskaną celulozę po procesie oczyszczania poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze 80°C, suszono na wagosuszarce w 60°C do momentu, kiedy waga celulozy została ustabilizowana.

Uzyskane wyniki wykazały, że dla przeprowadzonej w ten sposób modyfikacji uzyskuje się, w odniesieniu do prób kontrolnych (niemodyfikowanej CB) współczynnik pochłaniania wody (SR) większy o ok. 28% po 30 min. oraz o ponad 370% po 24h inkubacji w wodzie, współczynnik utrzymywania cieczy (WHC) wyższy o ok. 60% i wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV) wyższy o ok. 940% po 30 min. wirowaniu mokrej CB przy 1000 obr/min. Ponadto otrzymana modyfikowana celuloza charakteryzuje się gęstością ok. 35 razy mniejszą w porównaniu do suchej niemodyfikowanej CB. Wyniki przedstawiono w tabeli.

Sposób obliczenia współczynnika pochłaniania wody (SR):

$$\%SR = \frac{(W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}})}{W_{\text{dry}}} 100\%$$

Gdzie, W_{wet} to masa uwodnionej CB, a W_{dry} to masa suchej CB.

Sposób obliczenia współczynnika utrzymywania cieczy (WHC):

$$\%WHC = \frac{(W_{\text{wet}} - W_{\text{dwet}})}{W_{\text{dry}}} 100\%$$

Gdzie, W_{wet} to masa uwodnionej CB, W_{dwet} to masa mokrej CB w danym czasie podczas suszenia/wirowania, a W_{dry} to masa suchej CB.

Sposób obliczenia współczynnika wtórnego pęcznienia (WRV):

$$\%WRV = \frac{(W_{\text{dwet}} - W_{\text{dry}})}{W_{\text{dwet}}} 100\%$$

Gdzie, W_{dwet} to masa mokrej CB w danym czasie podczas suszenia/wirowania, a W_{dry} to masa suchej CB.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) jako katalizatora. CB modyfikowana w ten sposób charakteryzuje się współczynnikiem pochłaniania wody (SR) większym o ok. 20% po 30 min. oraz o 280% po 24h inkubacji w wodzie, współczynnik utrzymywania cieczy (WHC) wyższy o ponad 50% oraz wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV) wyższy o ok. 930% po 30 min. odwirowywaniu wody. Ponadto otrzymana modyfikowana celuloza charakteryzuje się gęstością ok. 34 razy mniejszą w porównaniu do suchej niemodyfikowanej CB. Wyniki przedstawiono w tabeli.

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem mieszaniny katalizatorów – wodorofosforanu disodu (Na_2HPO_4) i wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) w stosunku wagowym 1:1. W przypadku zastosowania tej modyfikacji otrzymano najwyższe wartości dla całkowitej zdolności pochłaniania cieczy. Dla celulozy modyfikowanej z zastosowaniem mieszaniny katalizatorów, w porównaniu do CB niemodyfikowanej, współczynnik pochłaniania wody (SR) był większy o ok. 18% po 30 min. oraz o ponad 500% po 24h inkubacji w wodzie, współczynnik utrzymywania cieczy (WHC) wyższy o ok. 55% oraz wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV) wyższy o ponad 940% po 30 min. odwirowywaniu wody. Ponadto otrzymana modyfikowana celuloza charakteryzuje się gęstością ok. 43 razy mniejszą w porównaniu do suchej niemodyfikowanej CB. Wyniki przedstawiono w tabeli.

Przykład 4

Metoda wytwarzania modyfikowanych mat celulozowych analogicznie jak w przykładach 1, 2 i 3, z tym, że po reakcji krzyżowego sieciowania wypłukaną i wysuszoną CB, w celu nadania jej odpowiednich właściwości, np. właściwości przeciwdrobnoustrojowych, wysyca się w inkubatorze z mieszanym roztworem substancji czynnej np. roztworem antyseptyku przez 1 - 24h. W celu oznaczenia czasu uwalniania zaimpregnowanej substancji czynnej, CB przenoszono do filtrów koszykowych umieszczonych w płytkach wielodołkowych z wodą w ten sposób, aby celuloza znalazła się na styku faz woda – powietrze. Następnie uwalnianie substancji

czynnej mierzono spektrofotometrycznie, pobierając strzykawką próbki i zawracając je do układu po wykonanym pomiarze. Stwierdzono, że CB modyfikowana sposobem według wynalazku, w porównaniu do CB niemodyfikowanej, charakteryzowała się wolniejszym i stopniowym uwalnianiem zaimpregnowanej substancji czynnej. Uzyskane dla modyfikowanej CB wyniki porównywano z CB niemodyfikowaną. Podczas gdy dla CB niemodyfikowanej zaobserwowano brak istotnych zmian w absorbancji po ok. 60 min. pomiaru (uwolniona została cała zaabsorbowana substancja, dla CB modyfikowanej czas ten przekraczał 480 min.

Przykład 5

Metoda wytwarzania modyfikowanych mat celulozowych analogicznie jak w przykładach 1,2 i 3, z tym, że po reakcji krzyżowego sieciowania, wypłukaną i wysuszoną CB, w celu zwiększenia jej elastyczności, impregnuje się przez 24h w 1 - 10% roztworze glicerolu rozgrzanego w łaźni wodnej do temperatury 80°C i w następnym etapie wysuszeniu tak uzyskanego materiału w temperaturze pokojowej. Procedura ta pozwala na poprawę elastyczności CB w stanie suchym, co jest istotne w przypadku materiałów mających dostosować się do różnych kształtów powierzchni, np. opatrunków mających przylegać do części ruchomych ciała.

Przykład 6

Metoda wytwarzania modyfikowanych mat celulozowych analogicznie jak w przykładach 1,2 i 3, z tym, że po reakcji krzyżowego sieciowania, wypłukaną i wysuszoną CB, w celu zwiększenia jej elastyczności, impregnuje się przez 24h w 1 - 10% roztworze glicerolu rozgrzanego w łaźni wodnej do temperatury 80°C i w następnym etapie wysuszeniu tak uzyskanego materiału w temperaturze pokojowej, a następnie wysyceniu go substancją czynną analogicznie jak w przykładzie 4. Stwierdzono, że CB modyfikowana sposobem według przykładu 6, charakteryzowała się dużą elastycznością, a przy tym wolniejszym i stopniowym uwalnianiem zaimpregnowanej substancji czynnej.

Tabela

	CB modyfikowana w wariantcie z Przykładu 1	CB modyfikowana w wariantcie z Przykładu 2	CB modyfikowana w wariantcie z Przykładu 3
SR po 30 min.	28%	20%	18%
WHC po 30 min.	60%	50%	55%

WRV po 30 min.	940%	930%	940%
SR po 24h	370%	280%	500%
gęstość	3400%	3300%	4200%