

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242134 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435325**

(22) Data zgłoszenia: **2020.09.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.10.18 BUP 29/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.23 WUP 04/2023**

(51) MKP:

C12P 3/00 (2006.01)

C01G 9/02 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU, Toruń, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANNA KRÓL-GÓRNIAK, Mogilno, PL
PAWEŁ POMASTOWSKI, Golub-Dobrzyń, PL
VIORICA RAILEAN-PLUGARU, Toruń, PL
BOGUSŁAW BUSZEWSKI, Stary Toruń, PL**

(74) Pełnomocnik:

Grzegorz Ćwikliński, Bydgoszcz, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymania antybakteryjnych nanokompozytów tlenku cynku

PL 242134 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania antybakteryjnych nanokompozytów tlenku cynku, z użyciem hodowli szczepu bakterii kwasu mlekowego, które mają zastosowanie w farmacji wobec szczepów patogennych, w szczególności *S. aureus*, *E. coli* oraz *K. pneumoniae*.

Cynk jest jednym z najważniejszych i niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mikroelementów – stanowi składnik centrów aktywnych wielu enzymów zaangażowanych w metabolizm, bierze udział w mineralizacji kości, gojeniu się ran, odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego, wydzielanie insuliny czy też utrzymanie prawidłowego stężenia witaminy A oraz cholesterolu. Chociaż cynk jest uznawany za stosunkowo nietoksyczny, to istnieje coraz więcej dowodów na to, że wolne jony cynku mogą powodować np. degradację neuronów, co ujawniono w publikacji Frederickson, Christopher J., Jae-Young Koh, and Ashley I. Bush. 2005. "The Neurobiology of Zinc in Health and Disease." *Nature Reviews Neuroscience* 6(6): 449-62. Wyeliminowanie cytotoksycznego działania jonów Zn^{2+} wykazano przez otrzymanie tlenku cynku w formie biokoloidów połączonych bioaktywnym ligandem – białkami bądź w formie nanokompozytów ZnO (ZnO NCs, ang. *Zinc Oxide Nanocomposites*) ujawnione w publikacji naukowej Pomastowski, Paweł et al. 2016. "Silver-Lactoferrin Nanocomplexes as a Potent Antimicrobial Agent." *Journal of the American Chemical Society* 138(25): 7899–7909. Podstawowymi metodami otrzymywania nano-ZnO są metody chemiczne oraz fizyczne, jednak otrzymane w ten sposób nanomateriały charakteryzują się wysoką cytotoksycznością w stosunku do komórek zwierzęcych i ludzkich, co dyskwalifikuje ich zastosowanie jako np. preparaty medyczne.

Mikrobiologiczny wewnątrzkomórkowy sposób otrzymania nanocząstek ZnO ujawniono w publikacji naukowej Kundu, Debasree et al. 2014. "Extracellular Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Rhodococcus Pyridinivorans* NT2: Multifunctional Textile Finishing, Biosafety Evaluation and in Vitro Drug Delivery in Colon Carcinoma." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140: 194–204 stosując mikroorganizmy gram-dodatnie (*Rhodococcus pyridinivorans*). Natomiast w publikacji Jayaseelan, C. et al. 2012. "Novel Microbial Route to Synthesize ZnO Nanoparticles Using *Aeromonas Hydrophila* and Their Activity against Pathogenic Bacteria and Fungi." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 90: 78–84, przedstawiono użycie bakterii gram-ujemnych (np. *Aeromonas hydrophila*) do otrzymania nanokompozytów ZnO. Zastosowanie bakterii probiotycznych kwasu mlekowego (np. *Lactobacillus plantarum* VITES07 lub *Lactobacillus paracasei* LB3) ujawniono w publikacji Selvarajan, E., and V. Mohanasrinivasan. 2013. "Biosynthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using *Lactobacillus Plantarum* VITES07." *Materials Letters* 112: 180–82.

Rajabairavi i jego współpracownicy przeprowadzili zewnątrzkomórkową biosyntezę nano-ZnO za pomocą supernatantu uzyskanego po hodowli *Sphingobacterium thalpophilum* i przy użyciu 1 mM azotanu cynku jako prekursora. Proces biosyntezy prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a następnie otrzymane próbki suszono w temperaturze 120°C. W rezultacie otrzymano nanocząstki o wielkości około 40 nm wykazujące działanie antybakteryjne wobec szczepów *P. aeruginosa* i *E. aerogenom*.

Celem wynalazku jest opracowanie szybkiego sposobu otrzymywania nanokompozytów tlenku cynku o właściwościach antybakteryjnych mających zastosowanie w farmacji wobec szczepów patogennych, w szczególności *Pseudomonas aureginosa* ATCC 15441, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1144 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania antybakteryjnych nanokompozytów tlenku cynku poprzez zewnątrzkomórkową biosyntezę z użyciem supernatantu uzyskanego z hodowli szczepu bakterii kwasu mlekowego oraz prekursora w postaci azotanu cynku charakteryzujący się tym, że szczep bakterii kwasu mlekowego to szczep *Lactobacillus paracasei* LPC20 zdeponowanego pod numerem B/00287 a do supernatantu pochodzącego dodaje się przy jednoczesnym mieszaniu azotan cynku w stężeniu 0,1 g/mL, przy czym proces biosyntezy prowadzi się w temperaturze 60°C przez 1 h, po czym supernatant ogrzewa się w temperaturze 100°C aż do całkowitego odparowania płynu i uzyskania nanokompozytu w formie proszku. Następnie nanokompozyt oczyszcza się poprzez trzykrotne płukanie wodą dejonizowaną z odwirowaniem.

Korzystnie, gdy nanokompozyt doczyszczają się poprzez dializę za pomocą membrany o granicznej masie molowej 3 kDa przez okres co najmniej 120 h.

Wynalazek przedstawiono w przykładzie wykonania.

Sposób otrzymania nanokompozytów ZnO w pierwszym etapie obejmuje hodowlę szczepu *L. Paracasei*, który został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM, PAN, Warszawa) pod numerem B/00287 zawierającego w przedziale od 10^7 do 10^8 CFU/mL żywych komórek w 100 mL pożywki płynnej MH (Mueller Hinton Broth; Sigma-Aldrich). Hodowlę prowadzono przez 48 h w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji hodowla bakteryjna została zwirowana (12000 rpm, 30 min, 20°C), a do uzyskanego supernatantu dodano heksahydrat azotanu cynku ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$) do stężenia 0,1 g/mL przy ciągłym mieszaniu i proces mieszania prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 60°C. Następnie mieszaninę poreakcyjną odwirowano przy prędkości 7000 rpm przez 15 min przy temperaturze 22°C, a uzyskany supernatant przeniesiony do nowego szklanego naczynia i ogrzewano w 100°C do odparowania płynu i uzyskania nanokompozytów tlenku cynku w formie proszku w ilości ok. 8 g. Otrzymany ZnO NCs oczyszczono poprzez przepłukanie 20 mL wodą dejonizowaną, worteksowane przez 10 min, poddane sonikacji w łaźni ultradźwiękowej przez 20 min oraz wirowane (10000 rpm, 10 min, 20°C). Oczyszczanie takie dokonano trzykrotnie. W celu wypłukania niezwiązanych jonów oraz niskocząsteczkowych metabolitów wstępnie oczyszczony nanokompozyt ZnO poddano 5-dniowej dializie przy użyciu membrany o granicznej masie molowej (*cut off*) 3 kDa (Spectrumlab, USA). Oczyszczone ZnO NCs poddano badaniom fizykochemicznym oraz testom na aktywności antibakteryjnej.

Obecność tlenku cynku potwierdzono przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) sprzężonego z detektorem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX).

Fig. 1 przedstawia obrazy kolejnych powiększeń struktur ZnO a **Fig. 2** widmo EDX co jednoznacznie potwierdza obecność ZnO.

Fig. 3 przedstawia obraz dyfrakcyjny (SAED), który potwierdza krystaliczną postać ZnO, a przedstawione na **Fig. 4** widmo dyfrakcyjne XRD wskazuje na tlenek cynku w formie wurcytu o stałych sieci $a = 0,3249$ nm i $c = 0,5208$ nm (zgodnie z kartą JCPDS nr 36-1451, P63mc). W przypadku syntezy kontrolnej (pożywka MH z dodatkiem prekursora) nie wykazano obecności ZnO NCs. Na podstawie otrzymanych wyników oraz równania Scherrera obliczony został krystaliczny rozmiar nanokompozytów, który wynosił $13,70 \pm 1,53$ nm.

Fig. 5 przedstawia wykres potencjału zeta ZnO NCs w przedziale pH 2–10, wskazując na stabilność struktury ZnO NCs przy największej stabilności nanocząstek w przedziale pH 7–9; średnia wartość potencjału wynosi $-29,15 \pm 1,05$ mV.

Fig. 6 przedstawia wynik badania za pomocą analizy termogravimetrycznej stabilności termicznej otrzymanych nanokompozytów ZnO NCs, które były stabilne termicznie do temperatury 130°C.

Fig. 7 przedstawia wynik badania spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Otrzymane dane wskazują na obecność depozytu organicznego na powierzchni nanokompozytów w postaci grup amidowych oraz karboksylowych. Dolny pik (5) w obszarze między $500-600$ cm^{-1} oznacza wiązanie Zn-O i potwierdza obecność tlenku cynku w badanej próbce.

Tabela 1 przedstawia skuteczność działania antibakteryjnego wytworzonych nanocząstek tlenku cynku wykazane poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*), czyli najmniejszego stężenia środka o właściwościach antibakteryjnych hamujące wzrost bakterii w warunkach *in vitro*. Wartość MIC jest wyrażona w $\mu g/mL$.

Mikroorganizm	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15441	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1144
ZnO NCs	86,25 $\mu g/mL$	172,5 $\mu g/mL$	-	172,5 $\mu g/mL$

Opracowany sposób jest proekologiczny. W sposobie według wynalazku nie został użyty żaden dodatkowy związek chemiczny, a wykorzystanie supernatantu po hodowli mikroorganizmów jest bezpieczne, gdyż posiadają one status GRAS (ang. *generally recognized as safe*). Ponadto, wykorzystanie serwatki z mleka krowiego, będącej drugim głównym odpadem ciekłym przemysłu mleczarskiego, doskonale wpisuje się w założenia zielonej chemii oraz zrównoważonego rozwoju. Aktualne wykorzystanie przemysłowe serwatki stanowi jedynie niewielki procent jej możliwości, dlatego też wykorzystanie jej w celu syntezy ZnO NCs, znacznie zwiększa wachlarz możliwości wykorzystania tego surowca. Zaproponowane interdyscyplinarne podejście oparte na wykorzystaniu technik stosowanych w naukach che-

micznych oraz mikrobiologicznych umożliwiło opracowanie metody syntezy nowatorskich nanokompozytów tlenku cynku przy wykorzystaniu supernatantu po hodowli szczepu *Lactobacillus paracasei* wyizolowanego z serwatki. Otrzymane nanokompozyty ZnO z depozytem organicznym na powierzchni, pozwalają na zastosowanie ich jako preparatów do leczenia np. trudno gojących się ran, i może stać się krokiem milowym w walce z lekoopornością bakterii czy grzybów.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania antybakteryjnych nanokompozytów tlenku cynku poprzez zewnątrzkomórkową biosyntezę z użyciem supernatantu uzyskanego z hodowli szczepu bakterii kwasu mlekowego oraz prekursora w postaci azotanu cynku **znamienny tym**, że szczep bakterii kwasu mlekowego to szczep *Lactobacillus paracasei* LPC20 zdeponowanego pod numerem B/00287 a do supernatantu pohodowlanego dodaje się przy jednoczesnym mieszaniu azotan cynku w stężeniu 0,1 g/mL, a proces biosyntezy prowadzi się w temperaturze 60°C przez 1 h, po czym supernatant ogrzewa się w temperaturze 100°C aż do całkowitego odparowania płynu i uzyskania nanokompozytu w formie proszku, następnie nanokompozyt oczyszcza się poprzez trzykrotne płukanie wodą dejonizowaną z odwirowaniem.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nanokompozyt doczyszczają się poprzez dializę za pomocą membrany o granicznej masie molowej 3 kDa przez okres co najmniej 120 h.

Rysunki



Fig. 1

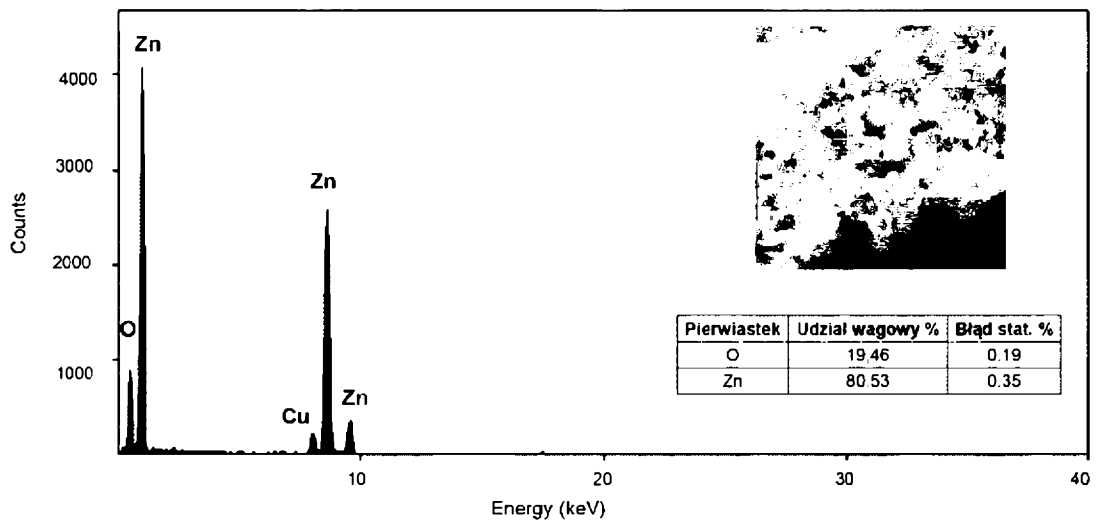


Fig. 2

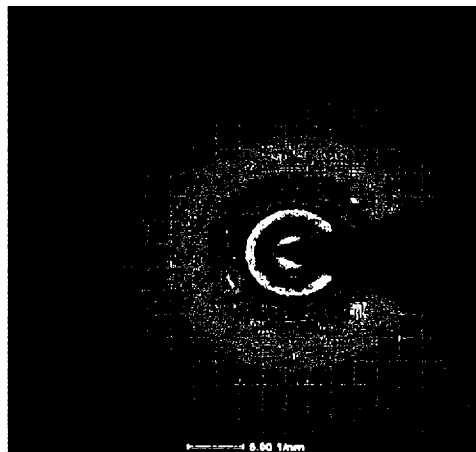


Fig. 3

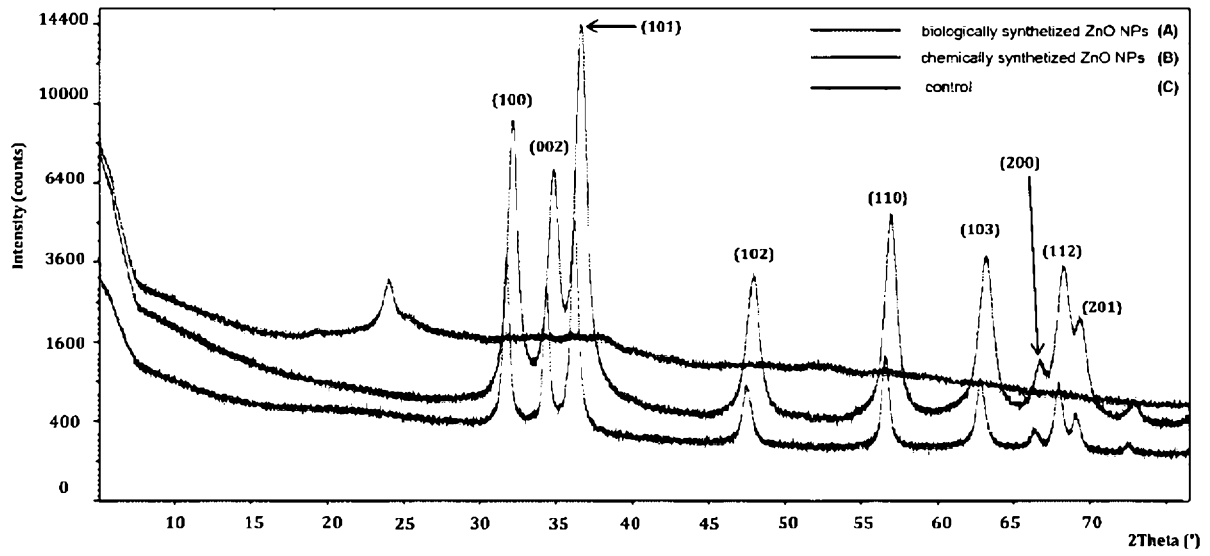


Fig. 4

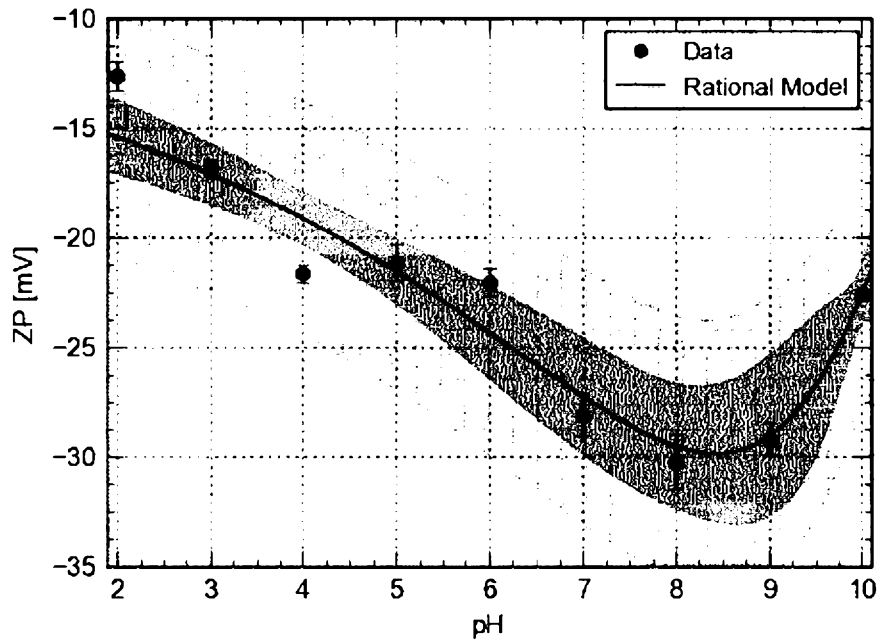


Fig. 5

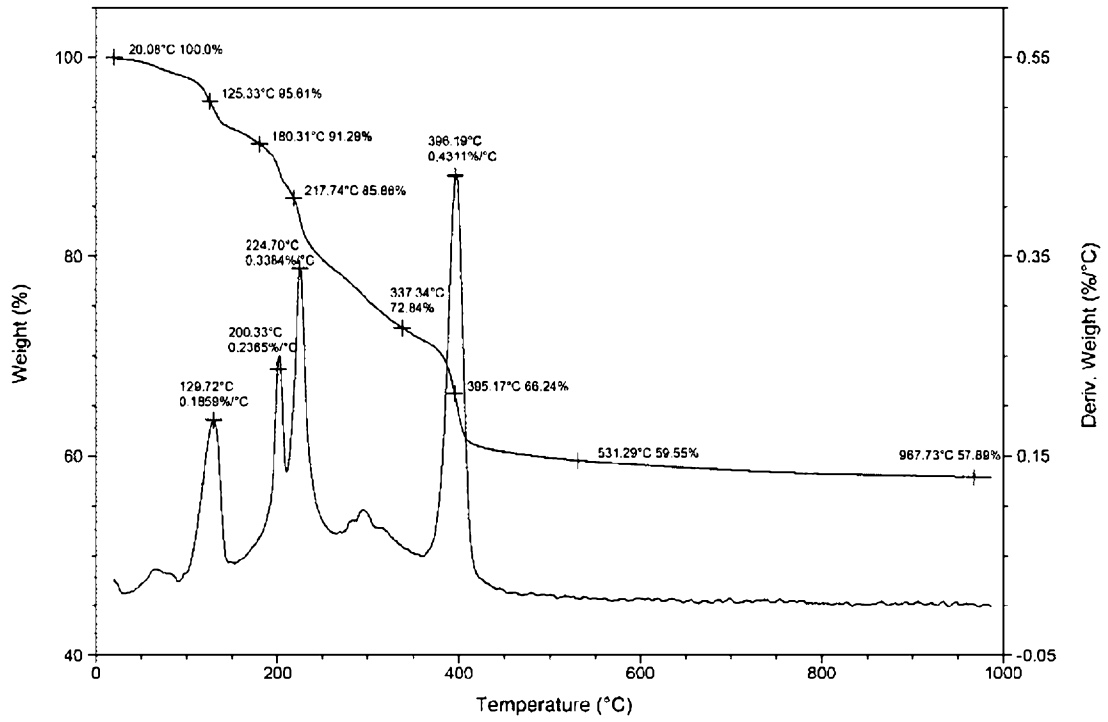


Fig. 6

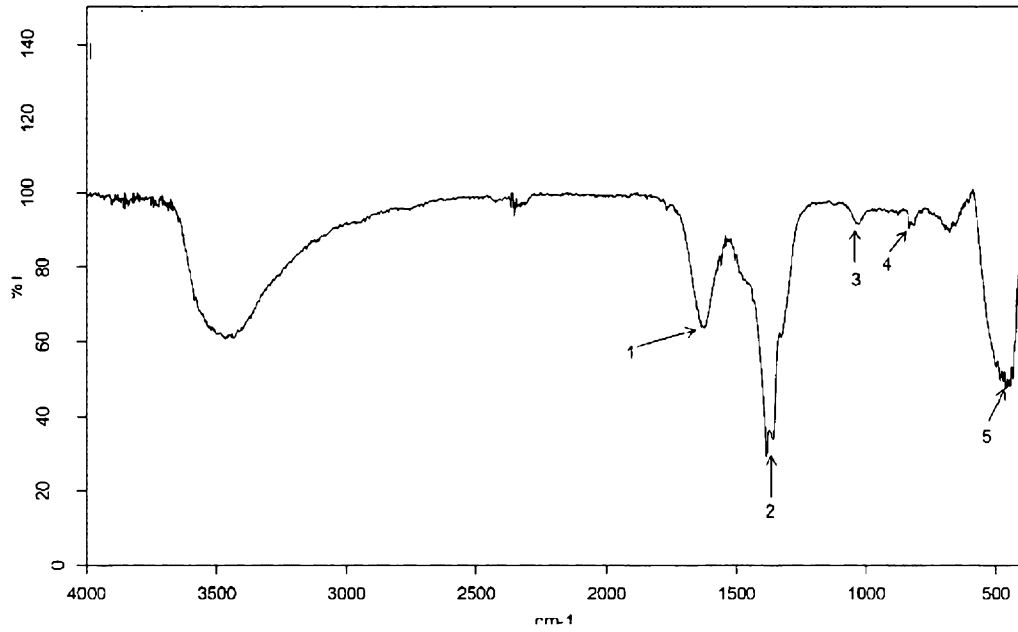


Fig. 7