

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241158**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431265**

(22) Data zgłoszenia: **25.09.2019**

(51) Int.Cl.

C12P 19/04 (2006.01)

C12R 1/02 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania bakteryjnej nanocelulozy w postaci błon
o wysokiej rozciągliwości i o rozluźnionej strukturze**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
06.04.2021 BUP 07/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
08.08.2022 WUP 32/22

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
IZABELA CIELECKA, Łódź, PL
STANISŁAW BIELECKI, Łódź, PL
TERESA PANKIEWICZ, Łódź, PL
JOLANTA PŁOSZYŃSKA, Łódź, PL
MAŁGORZATA RYNGAJŁŁO, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 241158 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bakteryjnej nanocelulozy (BNC) w postaci błon o wysokiej rozciągliwości i o rozluźnionej strukturze.

Celuloza bakteryjna jest polisacharydem złożonym z reszt D-glukopiranozy, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Jest ona wytwarzana przez mikroorganizmy, takie jak bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Dikeya* i *Sarcina*, ale najwydajniejszymi producentami tego biopolimeru są bakterie z rodzaju *Acetobacteraceae*, szczególnie z gatunku *Komagataeibacter* (wcześniej *Gluconacetobacter*) (czasopismo *Cellulose*, 2013, t. 20, nr 5, s. 2191–2219). W hodowli stacjonarnej bakterii, celuloza bakteryjna jest gromadzona na powierzchni pożywki w formie błon o charakterze hydrożelu, składającego się w 99% z wody i w 1% z czystej chemicznie celulozy. Błony celulozowe zbudowane są z nanowłókien o średnicy w zakresie 20–100 nm, o stopniu polimeryzacji 4000–10000, ułożonych w trójwymiarową sieć o wysokiej krystaliczności (czasopismo *Angewandte Chemie: International Edition*, 2011, t. 50, s. 5438–5466). Celuloza bakteryjna znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, takich jak medycyna i farmacja, kosmetyka, przemysł spożywczy, papiernictwo, elektronika i akustyka, a także ochrona środowiska. Wysokie zainteresowanie tym biomateriałem i szeroki potencjał aplikacyjny wynikają z jego unikatowych właściwości, przede wszystkim biokompatybilności i nietoksyczności, wysokiej zawartości wody, uporządkowanej krystalicznej struktury oraz wysokiej wytrzymałości mechanicznej (czasopismo *Cellulose*, 2016, t. 23, nr. 4, s. 2291–2314). Parametry fizyko-chemiczne celulozy bakteryjnej oraz wydajność jej biosyntezy są ściśle uzależnione od szeregu czynników, takich jak szczep produkcyjny, metoda hodowli i rodzaj stosowanego bioreaktora, skład podłoża hodowlanego i w szczególności źródło węgla i azotu czy też dodatki stosowane do podłoża (czasopismo *Macromolecular Bioscience*, 2014, t. 14, s. 10–32).

Znane są sposoby otrzymywania celulozy bakteryjnej w formie błon z zastosowaniem różnych szczepów bakterii octowych, w hodowli stacjonarnej.

W opisie patentowym PL171952 ujawniono sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej w formie błon w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii *Acetobacter xylinum* P23.

Z opisu patentowego PL185337 znana jest metoda dwustopniowego wytwarzania celulozy bakteryjnej w formie błon, z zastosowaniem szczepu bakterii *Acetobacter xylinum*.

Znana jest z opisu patentowego PL 212003, metoda wytwarzania celulozy bakteryjnej z zastosowaniem bakterii *Acetobacter xylinum* w hodowli stacjonarnej poprzedzonej preinkubacją.

W opisie patentowym PL 216180 ujawniono sposób wytwarzania bionanocelulozy z zastosowaniem szczepu bakterii *Gluconacetobacter xylinus* E25, który przechowuje się w formie liofilizowanej z odtłuszczonym mlekiem lub w formie liofilizowanej z glicerolem. Liofilizat służy do przygotowania inokulum na podłożu hodowlanym o składzie: 2% glukozy, 0,9% etanolu, 0,1% kwasu cytrynowego, 0,5% ekstraktu drożdżowego oraz sole mineralne 0,05% $MgSO_4$ oraz 0,30% Na_2HPO_4 . Podłoże hodowlane stanowi również ciecz pohodowlana oraz woda wodociągowa po płukaniu błon roztworem wodorotlenku sodu. Zaszczepione podłoże poddaje się preinkubacji w temperaturze 27–30°C w biomieszalnikach, a następnie prowadzi się hodowlę właściwą w temperaturze 27–30°C w czasie 2–11 dni, w warunkach stacjonarnych, a uzyskane błony celulozowe na koniec oczyszcza się.

Znana jest także, z opisu patentowego PL 227860 metoda otrzymywania celulozy w formie błon, o zwiększonej absorpcji wody, w warunkach hodowli stacjonarnej bakterii *Gluconacetobacter xylinus*, w której inokulum przygotowuje się w płynnym podłożu *Hestrin-Schramm* o składzie: 2% glukozy, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 0,5% peptonu, 0,115% kwasu cytrynowego, 0,27% Na_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$ uzupełnionego 1% etanolu, w temperaturze 28–30°C, w czasie 7 dni. Tak przygotowanym inokulum szczepi się podłoże produkcyjne i prowadzi hodowlę przez 3 dni, przy pH początkowym 4,5–5,5, w temperaturze 28–30°C i w obecności wirującego pola magnetycznego. Następnie otrzymane błony oczyszcza się i suszy.

Z opisu zgłoszenia patentowego P 416817 znana jest metoda wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem bakterii *Gluconacetobacter xylinus* w hodowli stacjonarnej poprzedzonej i/lub zakończonej ekspozycją na pole magnetyczne.

W opisie zgłoszenia patentowego US 5962278A ujawniono metodę otrzymywania bionanocelulozy w hodowli szczepu bakterii *Acetobacter xylinum subsp. nonacetooxidans*.

W opisach zgłoszeń patentowych US 20030203013A1, US 20040028722A1 oraz US 20050019380A1 przedstawiono metodę otrzymywania celulozy bakteryjnej w postaci błon celulozowych przez bakterie *Acetobacter xylinum* w hodowli stacjonarnej.

W opisie zgłoszenia patentowego JPH 0739386A ujawniono metodę wytwarzania celulozy bakteryjnej w oparciu o hodowlę bakterii z rodzaju *Acetobacter*, jak *Acetobacter xylinum* ATCC23768, BPR200, ATCC10821, ATCC23769.

W opisie zgłoszenia patentowego US 5580782A ujawniono metodę otrzymywania celulozy bakteryjnej w czasie 4-dniowej hodowli z zastosowaniem szczepu bakterii *Acetobacter xylinum* BPR2001.

Z opisu zgłoszenia patentowego US 20030032148A1 znany jest sposób otrzymywania celulozy mikrobiologicznej o wysokim stopniu polimeryzacji, w wyniku hodowli, mieszanej lub stacjonarnej, mutantów bakterii *Acetobacter xylinum* BPR2001.

Znany jest także, z opisu patentowego US 4912049 sposób wytwarzania filmu celulozowego o podwyższonej rozciągliwości z zastosowaniem bakterii *Acetobacter xylinum*, w hodowli stacjonarnej prowadzonej w temperaturze pozwalającej na aktywność metaboliczną bakterii i w czasie pozwalającym na uzyskanie materiału o pożądanej grubości. Tak otrzymane błony celulozowe wykazują rozciągliwość równą 74%.

Badania nad wpływem witamin na syntezę nanocelulozy bakteryjnej ujawniały, że najlepszymi stymulatorami procesu są pirydoksyna, kwas nikotynowy, kwas p-aminobenzoowy oraz biotyna.

W czasopiśmie *Carbohydrates Polymers*, 2014 r., t. 99, s. 98–100, opisano metodę zwiększenia wydajności biosyntezy celulozy bakteryjnej w hodowli szczepów bakteryjnych *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245, IFO 13693, IFO 13772 oraz IFO 13773, poprzez modyfikację podłoża hodowlanego Hestrin-Schram o składzie: 20 g/l glukozy, 5 g/l peptonu, 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 2,7 g/l dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 g/l kwasu cytrynowego, 0,5 g/l siarczanu magnezu, polegającą na uzupełnieniu medium hodowlanego 0,5% dodatkiem witaminy C. Hodowlę prowadzono przy pH 6,0 w temperaturze 28°C przez 7 dni.

Obecnie znane metody otrzymywania celulozy bakteryjnej pozwalają na otrzymywanie biomateriału o wysokiej wytrzymałości na zrywanie, ale o niskim współczynniku rozciągliwości.

W czasopiśmie *Food Hydrocolloids*, 2018 r., t. 81, s. 87–95, opisano metodę otrzymywania błon celulozowych z wykorzystaniem sześciu szczepów *Komagataeibacter xylinus*: ATCC 53524, ATCC 10245, ATCC 23769, ATCC 700178 oraz *Komagataeibacter xylinus* NBRC 13693, w hodowli stacjonarnej na podłożu zawierającym 20 g/l glukozy, 5 g/l peptonu, 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 2,7 g/l dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 g/l kwasu cytrynowego, przy pH 5,0 w temperaturze 30°C przez 3 dni, w bioreaktorze cylindrycznym o średnicy 40 mm. Tak otrzymane błony w stanie mokrym charakteryzują się rozciągliwością odpowiednio 20,72%, 18,60%, 17,97%, 20,72% oraz 16,20%.

Znane są także sposoby uzyskiwania materiału celulozowego o zmienionych parametrach wytrzymałościowych, w tym rozciągliwości, poprzez modyfikację celulozy bakteryjnej.

W czasopiśmie *Advanced Functional Materials*, 2004 r., t. 14, nr 11, s. 1124–1128, opisano metodę modyfikacji celulozy bakteryjnej uzyskanej w hodowli bakterii *Acetobacter xylinum* ATCC 53582, polegającą na zamoczeniu błony w roztworze żelatyny o stężeniu 15–50% i chemicznym usieciowaniu z zastosowaniem wodnego roztworu wodorochlorku N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarboimidu. Tak uzyskany kompozyt wykazywał rozciągliwość na poziomie 28%, przy 22% dla próby kontrolnej. Ponadto, w artykule wykazano, że modyfikacja celulozy bakteryjnej z użyciem alginianu sodu w temperaturze 70°C i następnie usieciwienie kompozytu roztworem CaCl₂ powoduje zwiększenie rozciągliwości materiału do 89%.

W zgłoszeniu patentowym US 4942128A opisano metodę otrzymywania modyfikowanej celulozy bakteryjnej, charakteryzującej się sprężystością i elastycznością w stanie suchym. Biomateriał powstaje w wyniku hodowli bakterii produkujących celulozę w podłożu suplementowanym pochodnymi celulozy, szczególnie karboksymetylocelulozą.

W literaturze opisane są również metody wytwarzania materiałów kompozytowych, w których celuloza bakteryjna stosowana jest jako komponent do wytworzenia materiału o wysokim stopniu rozciągliwości i wysokim module sprężystości.

Z opisu patentowego US 4742164 znany jest sposób otrzymywania materiału łatwo kształtowanego, o wysokiej dynamicznej wytrzymałości, zawierającego mikrofibryle celulozy bakteryjnej. Przedstawiona metoda polega na poddaniu błon celulozowych maceracji i/lub ściskaniu pod ciśnieniem i następnie suszeniu. Dodatkowo materiał może charakteryzować się jednoosiowym ułożeniem włókien, co

według metody uzyskuje się w procesie rolowania. Tak uzyskiwany materiał charakteryzuje się modulem sprężystości równym przynajmniej 7,4 GPa i może być formowany w arkusze, wstęgi i płachty. Właściwości opisanego materiału modyfikuje się w zależności od przeznaczenia, poprzez inkorporację odpowiednich składników organicznych i nieorganicznych do jego struktury.

W opisie zgłoszenia patentowego US 5846213A ujawniono sposób modyfikacji celulozy bakteryjnej, polegający na produkcji celulozy w hodowli bakterii z rodzaju *Acetobacter* w zbiorniku z mieszanym i następnie rozpuszczeniu biomateriału w układzie rozpuszczalników dimetyloacetoamid/chlorek litu. Kolejno roztwór odlewa się na płaskiej powierzchni i poddaje się regeneracji w kąpeli żelującej oraz wprowadza się humektant w procesie wymiany rozpuszczalników. Opisany sposób prowadzi do otrzymania filmów celulozowych o rozciągliwości w zakresie 37–143%.

Niemodyfikowana celuloza bakteryjna otrzymywana w znanych, opisanych powyżej sposobach w drodze hodowli różnych szczepów bakterii nie wykazuje struktury rozluźnionej ani też zwiększonej podatności na rozciąganie.

Prowadzone w ostatnich latach badania nad wykorzystywaniem nanocelulozy bakteryjnej wykazały, że nanoceluloza bakteryjna wykazuje wysoką biokompatybilność i doskonale nadaje się do zastosowań wewnętrznych w medycynie regeneracyjnej, przy czym celuloza ta, o strukturze mocno rozluźnionej, może być matrycą na przykład do osadzania komórek eukariotycznych w hodowlach tkankowych lub matrycą do immobilizacji białek enzymatycznych, leków i innych związków aktywnych. Nadto stwierdzono, że nanoceluloza bakteryjna o zwiększonej podatności na rozciąganie (o niskim module Younga) może znaleźć zastosowanie do wytwarzania inteligentnych opakowań, w kosmetologii, kosmetyce, kardiologii.

W Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk z siedzibą we Wrocławiu, pod numerem B/00222 został zdeponowany szczep bakterii *Komagataeibacter hansenii* SI1.

Szczep *Komagataeibacter hansenii* SI1 został wyodrębniony z herbaty Kombucha. Komórki tego szczepu występują w postaci tlenowych, owalnych, pojedynczych pałeczek lub układają się podwójnie lub w łańcuszki. Komórki nie wytwarzają przetrwalników. Na podłożu SH (podłożu Hestrin-Schram) zestalonym agarem, szczep wytwarza okrągłe, wypukłe i gładkie kolonie o barwie od jasnokremowej do bladoróżowej. Komórki szczepu *Komagataeibacter hansenii* SI1 wydajnie metabolizują glukozę, fruktozę, mannitol, glicerol i sacharozę do celulozy. Szczep zachowuje zdolności produkcyjne w temperaturze 28–32°C przy pH 3,5–7,5 oraz pozytywnie reaguje na 1% dodatek etanolu do podłoża produkcyjnego.

Sposób otrzymywania nanocelulozy bakteryjnej w postaci błon o wysokiej rozciągliwości i o rozluźnionej strukturze, w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii z rodziny *Komagataeibacter*, w którym szczep bakterii *Komagataeibacter*, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, aktywuje się poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym 2% agarem, o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego, 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubacją w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, następnie przenosi się jedną kolonię zaktywowanych bakterii do 5 ml płynnego podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i po inkubacji w czasie dalszych 3 dni w temperaturze 30°C, nagromadzoną biomasę wraz z wyrośniętą błoną celulozową przenosi się do podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego, stosując całość nagromadzonej biomasy na 100 ml podłoża i prowadzi inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, po czym tak przygotowaną zawiesinę inokulum, po intensywnym jej wymieszaniu, zaszczenia się podłoże hodowli produkcyjnej o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części MgSO₄ x 7H₂O, 2,7 części Na₂HPO₄, 1,15 części kwasu cytrynowego, wzbogacone dodatkowo kwasem askorbinowym dodanym w ilości do 3%, korzystnie 0,5% wagowych masy podłoża, stosując 2–10% v/v, korzystnie 5% v/v inokulum w stosunku do objętości podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach stacjonarnych, w czasie 5–12, korzystnie 7 dni w temperaturze 28–32°C, korzystnie 30°C i po zakończeniu hodowli produkcyjnej, błonę celulozową powstałą na powierzchni podłoża poddaje się oczyszczaniu polegającemu kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w temperaturze 100°C w czasie 1 godziny lub 1–2% wodnym roztworem tego wodorotlenku w czasie 20–24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 20–24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej i następnie w wodzie destylowanej,

według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się szczep bakterii *Komagataeibacter hansenii* SI1.

Nanoceluloza bakteryjna wytworzona sposobem według wynalazku charakteryzuje się wysoką rozciągliwością we wszystkich kierunkach przy niskich wartościach naprężenia oraz wyjątkowo rozluźnioną strukturą, daje się łatwo modelować do dowolnego kształtu, zachowuje nadany kształt po modyfikacji, jest biokompatybilna i biodegradowalna, jak również stanowi barierę ochronną dla mikroorganizmów. Jest potencjalnie lepszym materiałem do osadzania komórek eukariotycznych niż bakteryjne celulozy wytworzone przez inne szczepy z gatunku *Komagataeibacter*.

Nanoceluloza wytworzona sposobem według wynalazku znajdzie zastosowanie jako biomateriał (skafold) do osadzania komórek eukariotycznych lub do immobilizacji białek, leków, związków chemicznych o działaniu bakteriostatycznym, bakteriobójczym, angiogennym oraz czynników wzrostu, lub na opatrunek do leczenia ran. Ponadto może znaleźć zastosowanie w kosmetologii, kosmetyce lub do wytwarzania inteligentnych opakowań.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady, z powołaniem się na rysunek, na którym fig. 1 przedstawia zdjęcie mikroskopowe struktury włókien nanocelulozy bakteryjnej otrzymanej w przykładzie 1, fig. 2 – zdjęcie mikroskopowe struktury włókien nanocelulozy bakteryjnej otrzymanej w przykładzie 2, fig. 3 - zdjęcie mikroskopowe struktury włókien w nanocelulozie bakteryjnej otrzymanej w przykładzie 3, fig. 4 – zdjęcie nanocelulozy bakteryjnej otrzymanej w przykładzie 2: przed rozciągnięciem (a), po rozciągnięciu (b), fig. 5 – zdjęcie nanocelulozy bakteryjnej otrzymanej w przykładzie 3: przed rozciągnięciem (a), po rozciągnięciu (b).

Przykład 1

Zawiesinę starterową przygotowano aktywując szczep *Komagataeibacter hansenii* SI1, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, poprzez posiew redukcyjny na podłożu SH (podłożu Hestrin-Schram) zestalonym 2% agarem, o składzie: 20 części wagowych glukozy, 5 części wagowych ekstraktu drożdżowego, 5 części wagowych aminobaku, 2,7 części wagowych sodu dwuwodorfosforanu, 1,15 części wagowych kwasu cytrynowego oraz 0,5 części wagowych magnezu siarczanu oraz inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C. Następnie dokonano transferu 1 kolonii aktywowanego szczepu do 5 ml podłoża inokulacyjnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i poddano inkubacji przez 3 dni w temperaturze 30°C. Nagromadzoną biomasę wraz z wyrośniętą błoną celulozową przeniesiono ilościowo do 100 ml podłoża inokulacyjnego i inkubowano przez 3 dni w temperaturze 30°C. Tak przygotowana zawiesina drobnoustrojów, po intensywnym wymieszaniu, stanowiła zawiesinę starterową do szczepienia właściwej hodowli.

200 ml podłoża produkcyjnego o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2,7 części Na_2HPO_4 , 1,15 części kwasu cytrynowego, zaszczepiono uzyskaną uprzednio zawiesiną starterową, użytą w ilości 5% v/v w stosunku do objętości podłoża i prowadzono hodowlę produkcyjną w bioreaktorach prostopadłościennych o wymiarach 14 cm x 10 cm x 6 cm (długość x szerokość x wysokość), w czasie 7 dni w temperaturze 30°C.

W tym czasie na powierzchni zaszczepionych podłoży przyrastała błona celulozowa do grubości około 5–7 mm. Po zakończeniu inkubacji, błony celulozowe poddano oczyszczaniu. Proces oczyszczania wytworzonych błon nanocelulozowych polegał kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w czasie 24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej, płukaniu w wodzie destylowanej. Wytworzone błony zapakowano i poddano sterylizacji.

Wydajność produkcji nanocelulozy bakteryjnej była równa 1,63 g suchej masy z 1 litra podłoża. Wytworzone błony celulozowe charakteryzowały się rozciągliwością równą 78% i modułem Younga równym 131 kPa. Badanie skaningowym mikroskopem elektronowym ujawniło luźną strukturę włókien celulozowych w błonie (fig. 1 rysunku) o średniej wielkości porów na poziomie 0,6 μm . Krystaliczność błon celulozowych wynosiła 85%.

Przykład 2

Hodowlę inokulum prowadzono postępując jak w przykładzie 1. Hodowlę produkcyjną prowadzono postępując jak w przykładzie 1, na podłożu o składzie jak w przykładzie 1, ale zawierającym dodatkowo kwas askorbinowy w ilości 0,5% wagowych masy podłoża. Proces oczyszczania powstałych błon nanocelulozowych prowadzono postępując jak w przykładzie 1.

Wydajność produkcji nanocelulozy bakteryjnej była równa 1,63 g suchej masy z 1 litra podłoża SH. Wytworzone błony nanocelulozowe charakteryzowały się rozciągliwością równą 97% i modułem Younga równym 142 kPa. Badanie skaningowym mikroskopem elektronowym ujawniło strukturę błony (fig. 2 rysunku) charakteryzującą się obecnością skupisk fibryli celulozowych z porami pomiędzy nimi o średniej wielkości 0,62 μm . Krystaliczność błony nanocelulozowej wytworzonej w tym przykładzie wynosiła 77%.

Na fig. 4 rysunku przedstawiono błonę nanocelulozy otrzymaną w tym przykładzie: a – przed rozciągnięciem, b – po rozciągnięciu.

Przykład 3

Hodowlę inokulum prowadzono postępując jak w przykładzie 1. Hodowlę produkcyjną prowadzono postępując jak w przykładzie 1, na podłożu o składzie jak w przykładzie 1, ale zawierającym dodatkowo kwas askorbinowy w ilości 1% wagowej masy podłoża. Proces oczyszczania powstałych błon nanocelulozowych prowadzono postępując jak w przykładzie 1.

Uzyskano wydajność produkcji nanocelulozy bakteryjnej równą 1,38 g suchej masy z 1 litra podłoża SH. Wytworzone błony nanocelulozowe charakteryzowały się rozciągliwością równą 123% i modułem Younga równym 101 kPa. Badanie skaningowym mikroskopem elektronowym ujawniło bardzo rozluźnioną strukturę błony (fig. 3 rysunku) charakteryzującą się czystymi, rozdzielonymi fibrylami celulozowymi z porami pomiędzy nimi o średniej wielkości 0,75 μm . Krystaliczność błony nanocelulozowej wytworzonej w tym przykładzie wynosiła 87%.

Na fig. 5 rysunku przedstawiono błonę nanocelulozy otrzymaną w tym przykładzie: a – przed rozciągnięciem, b – po rozciągnięciu.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania nanocelulozy bakteryjnej w postaci błon o wysokiej rozciągliwości i o rozluźnionej strukturze, w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii z rodziny *Komagataeibacter*, w którym szczep bakterii *Komagataeibacter*, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, aktywuje się poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym 2% agarem, o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego, 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, następnie przenosi się jedną kolonię zaktywowanych bakterii do 5 ml płynnego podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i po inkubacji w czasie dalszych 3 dni w temperaturze 30°C, nagromadzoną biomasę wraz z wyrośniętą błoną celulozową przenosi się do podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego, stosując całość nagromadzonej biomasy na 100 ml podłoża i prowadzi inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, po czym tak przygotowaną zawiesinę inokulum, po intensywnym jej wymieszaniu, zaszczepia się podłoże hodowli produkcyjnej o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2,7 części Na_2HPO_4 , 1,15 części kwasu cytrynowego, wzbogacone dodatkowo kwasem askorbinowym dodanym w ilości do 3%, korzystnie 0,5% wagowych masy podłoża, stosując 2–10% v/v, korzystnie 5% v/v inokulum w stosunku do objętości podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach stacjonarnych, w czasie 5–12, korzystnie 7 dni w temperaturze 28–32°C, korzystnie 30°C i po zakończeniu hodowli produkcyjnej, błonę celulozową powstałą na powierzchni podłoża poddaje się oczyszczaniu polegającemu kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w temperaturze 100°C w czasie 1 godziny lub 1–2% wodnym roztworem tego wodorotlenku w czasie 20–24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 20–24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej i następnie w wodzie destylowanej, **znamienny tym**, że stosuje się szczep bakterii *Komagataeibacter hansenii* S11 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk z siedzibą we Wrocławiu, pod numerem B/00222.

Rysunki

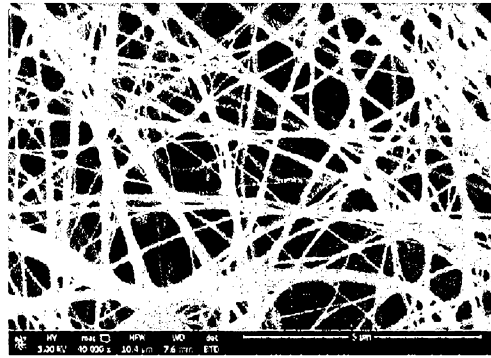


Fig. 1

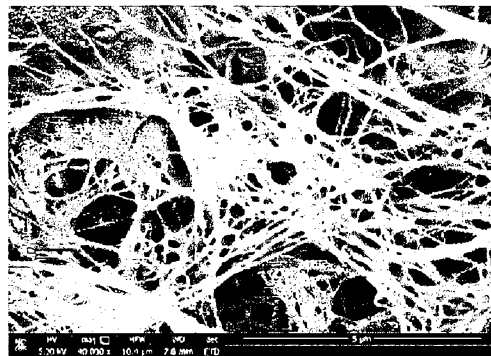


Fig. 2

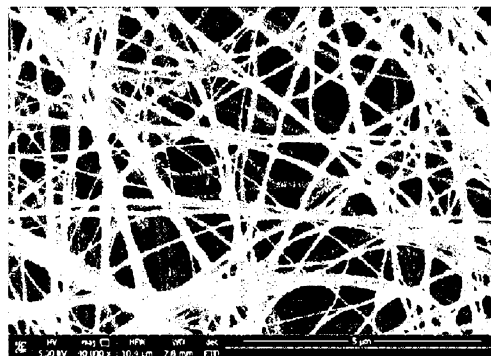


Fig. 3

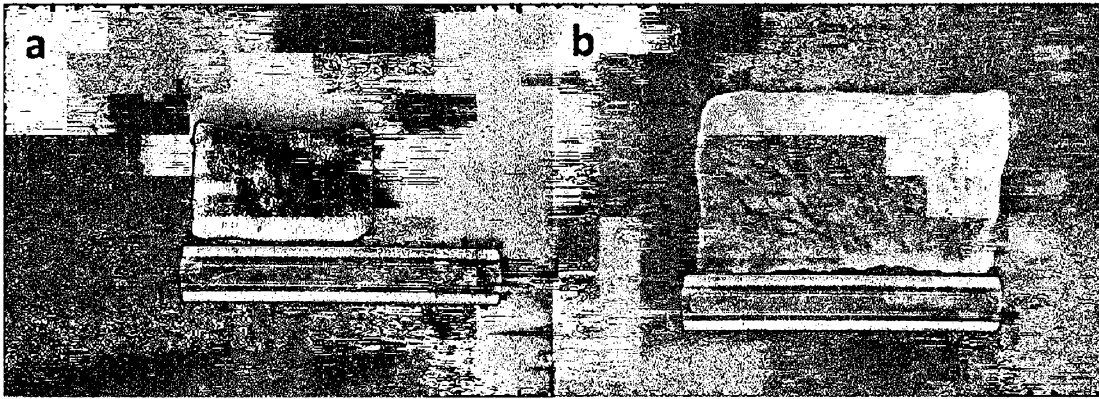


Fig. 4

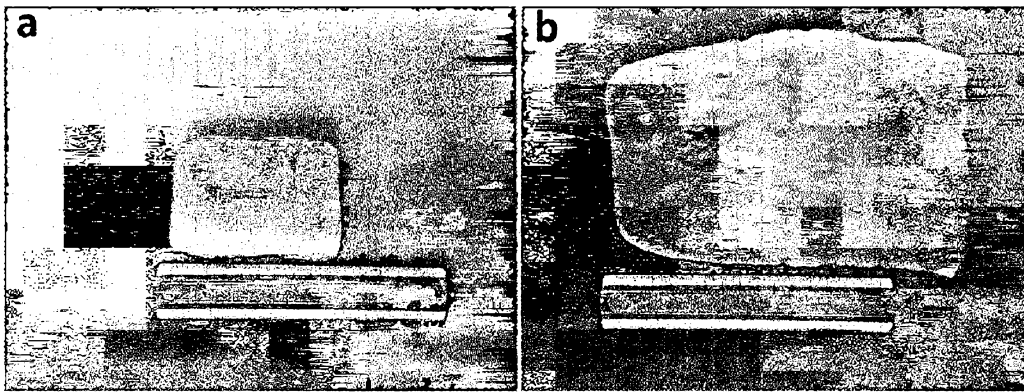


Fig. 5