

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243532 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439150**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.11 BUP 15/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.04 WUP 36/2023**

(51) MKP:

C12P 19/04 (2006.01)

B01D 39/18 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,
Szczecin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**KAROL FIJAŁKOWSKI, Szczecin, PL
MIROSŁAWA EL FRAY, Dobra Szczecińska, PL
RADOSŁAW DROZD, Szczecin, PL
ANNA ŻYWICKA, Łobez, PL
PIOTR SOBOLEWSKI, Szczecin, PL
DARIA CIECHOLEWSKA-JUŚKO, Szczecin, PL
MAGDALENA SZYMAŃSKA, Szczecin, PL**

(74) Pełnomocnik:

Monika Wielecka, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie
bionanocelulozy**

PL 243532 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie bionanocelulozy (BNC) wytwarzanej w warunkach hodowli stacjonarnej lub dynamicznej z wykorzystaniem szczepu z rodzaju *Komagataeibacter* (wcześniej *Gluconacteobacter*), korzystnie *Komagataeibacter xylinus*.

Wykorzystanie materiałów na bazie BNC w medycynie i innych gałęziach przemysłu jest możliwe dzięki takim jej właściwościom jak wysoka czystość, wytrzymałość mechaniczna, zdolność chłonięcia cieczy, nietoksyczność i biokompatybilność. Ponadto materiał uzyskiwany z BNC jest porowaty, elastyczny, w pełni biodegradowalny, łatwy w zastosowaniu i przechowywaniu, dodatkowo może być sterylizowany termicznie.

Struktura produkowanej BNC 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 czy w przemyśle spożywczym. Poza zastosowaniem odpowiednich warunków hodowlanych podczas procesu produkcji BNC, istnieje wiele innych metod jej modyfikacji, w tym np. manipulacje genetyczne bakterii wytwarzających BNC lub modyfikacje wytworzonej BNC poprzez zastosowanie czynników chemicznych i/lub fizycznych. Sposoby biosyntezy, modyfikacji oraz zastosowania BNC opisane są w licznych zgłoszeniach patentowych.

Opis patentowy PL 185337 dotyczy sposobu wytwarzania BNC z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum*. Prezentowana metoda jest dwuetapowa, przy czym w pierwszym etapie przygotowania inokulum stosowana jest eza szczepu na 25–50 cm³ podłoża (czas inkubacji 40–48 h), zaś w drugim etapie przygotowania inokulum, pożywką z utworzoną na niej błoną, po intensywnym zmieszaniu, zaszczenia się podłoże (5–10% wag. zawiesiny na 200–300 cm³ podłoża; czas inkubacji 40–48 h). 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 BNC na drodze hodowli bakterii kwasu octowego 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 BNC w warunkach hodowli stacjonarnej z zastosowaniem szczepu *A. xylinum*. Przed właściwą hodowlą produkcyjną stosuje się 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.

W zgłoszeniu patentowym PL 430888 przedstawiono sposób wytwarzania modyfikowanej BNC, który polega na impregnacji oczyszczonej BNC w mieszaninie 20% roztworu kwasu cytrynowego, a następnie przeprowadzeniu reakcji krzyżowego sieciowania w obecności 5–15% roztworu wodorofosforanu disodu i/lub wodorowęglanu sodu jako katalizatora (korzystnie w stosunku wagowym kwasu cytrynowego do katalizatora od 1:1 do 6:1, w temperaturze 120–200°C). Chemicznie modyfikowana poprzez reakcję krzyżowego sieciowania BNC, z zastosowaniem katalizatorów, charakteryzuje się zwiększoną porowatością oraz chłonnością.

W opisach wynalazków 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 wynalazku US 2009/0017506 omówiono otrzymywanie BNC z zastosowaniem *A. 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.

Pomimo opisanych powyżej sposobów otrzymywania BNC i możliwych aplikacji tego unikalnego biomateriału 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 BNC, a tym samym w pełni wykorzystać ich potencjał aplikacyjny.

Ze względu na szerzącą się epidemię COVID-19, w Polsce, jak i w wielu innych krajach Europy i całego świata, wprowadzono obowiązek zasłaniania ust i nosa. Najpowszechniej stosowane są maseczki chirurgiczne jednorazowego użytku. Do produkcji membran filtracyjnych wykorzystywanych w maskach czy respiratorach wykorzystuje się syntetyczne włókna polimerowe, takie jak polipropylen (PP) (głównie), poli(tereftalan etylenu), poli(tetrafluoroetylen) i włókna poliwęglanowe (Junter i Lebrun, 2017). Modyfikacje tego rodzaju materiałów wymagają użycia wielu niebezpiecznych rozpuszczalników. Obecnie intensywnie poszukuje się materiałów bardziej przyjaznych dla środowiska, naturalnych i biodegradowalnych. Wiele obecnie proponowanych nowatorskich membran filtracyjnych opiera się na celulozie roślinnej. Tego typu membrany były testowane jako alternatywne filtry dla środków ochrony dróg oddechowych (Dato i in. 2006; Davies i in. 2013; Rengasamy i in. 2010). Okazuje się jednak, że filtracja powietrza poprzez membrany celulozowe jest mniej skuteczna w porównaniu do filtracji w mediach płynnych (Balaras i in. 2007). W celu zwiększenia efektywności procesu filtracji, proponowano różnego rodzaju modyfikacje chemiczne poprzez powlekanie materiału bazowego syntetycznymi polimerami np. poli(etylenoiminą) (PEI), wykorzystanie pochodnych celulozy tj. azotanu celulozy, mieszaniny estrów celulozy, trioctanu celulozy, octanoftalanu celulozy (US 2008/0295843 A1, US 8,678,002 B2; 2012/0060258 A1; US 2006/0021302 A1).

BNC jak dotąd była wykorzystywana głównie jako filtr do oczyszczania wody. Potwierdzono jej skuteczność filtracyjną względem zarówno bakterii jak i wirusów (Hassan i in., 2017; Isik i in., 2018; Oshima i in., 2008). Niewiele jest jednak doniesień dotyczących wykorzystania BNC jako filtra powietrza. W zgłoszeniu patentowym CN 101589854 A opisano metodę wytwarzania filtra na bazie BNC, który dodatkowo impregnowano nanocząstkami srebra. Rozwiązanie ujawnia maskę bakteryjno-celulozową z filtrem powietrza i sposób jej wytwarzania. Maskę wykonaną jest z wysuszonej celulozy bakteryjnej, która służy jako materiał na oprawę maski. Sposób przygotowania obejmuje następujące etapy: wybranie *acetobacter xylinum* jako szczepu typu i hodowanie *acetobacter xylinum* w celu uzyskania bakteryjnej błony celulozowej; a po namoczeniu membrany w ługu kwaśnym i ługu alkalicznym przemycie namoczoną membranę do stopnia zanieczyszczenia poniżej 0,5%, namoczenie membrany w roztworze nanosrebra, następnie wysuszenie membrany w trybie liofilizacji i uzyskanie maski bakteryjno-celulozowej z filtrem powietrza poprzez preparat złożony. Proces przygotowania jest prosty, działanie filtrujące maski można skutecznie poprawić stosując celulozę bakteryjną jako materiał, a właściwości bakterio-bójcze i antytoksyczne maski są zwiększone przez zanurzenie w roztworze nanosrebra; a maska ma cechy niskiego kosztu produkcji, silną zdolność adsorpcji, wysoką aktywność bakterio-bójczą, długi czas bakterio-bójczy i tym podobne, i może skutecznie zmniejszać zużycie zasobów i chronić środowisko.

W zgłoszeniu patentowym JP 2011167226 A zaproponowano trójwarstwowy filtr z BNC, sztucznego jedwabiu oraz gąbki poliuretanowej. BNC dodatkowo impregnowano zeolitem srebra oraz środkiem utrzymującym wilgoć. W opisie wynalazku CN 102321261 A zaproponowano maskę z BNC impregnowaną chitozanem. Włókna BNC mieszano dodatkowo z poli(alkoholem winylowym), w celu poprawy wytrzymałości mechanicznej i przepuszczalności powietrza przez membranę. W tym kontekście niewiele jest doniesień literaturowych związanych z modyfikacjami materiałów filtracyjnych na bazie BNC.

Sposób wytwarzania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie bionanocelulozy, według wynalazku, polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczenie na podłożu płynnym Hestrin-Schramm zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oraz alkohol etylowy, bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter 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 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, charakteryzuje się tym, że tak otrzymaną celulozę homogenizuje się, rozcieńcza wodą w stosunku wagowym 1:1 albo 2:1 albo 1:2, następnie zamraża i poddaje procesowi liofilizacji.

Otrzymany według wynalazku materiał ma właściwości, które ukierunkowują jego zastosowanie jako filtra o dowolnym kształcie i rozmiarze. Może on być wykorzystany jako warstwa filtracyjna w maseczkach chirurgicznych (jednorazowych) oraz jako wkład do filtrów oddechowych czy respiratorów klasy N95, FFP2 i FFP3 (wielorazowych), w tym w obudowach wykonanych techniką druku 3D. Ponadto, innowacyjny materiał na bazie modyfikowanej BNC może zostać wykorzystany jako element systemu

oczyszczania powietrza w pomieszczeniach zamkniętych, takich jak szpitale, kliniki, laboratoria, szkoły lub w innych ważnych obiektach ekonomiczno-gospodarczych (np. jako filtr przemysłowy). Jest on biokompatybilny, co oznacza, że nie wykazuje on efektu cytotoksycznego względem hodowli komórek *in vitro*. Otrzymany materiał jako filtr jest lekki, tani w produkcji i przyjazny dla środowiska (biodegradowalny).

Istotną zaletą rozwiązania według wynalazku jest ponadto możliwość wykorzystania odpadów przemysłu rolno-spożywczego jako nowych źródeł składników odżywczych dla bakterii syntetyzujących celulozę. Jako pożywkę produkcyjną można zastosować pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1–1:3, tak jak to opisano opisanej w polskim zgłoszeniu patentowym P.433327.

Sposób według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania oraz na rysunku, przedstawiającym zdjęcia otrzymanych materiałów, przy czym fig. 1 przedstawia zdjęcie pulpy celulozowej rozcieńczonej wodą w stosunku wagowym 1:2, fig. 2 – zdjęcie pulpy celulozowej rozcieńczonej wodą w stosunku 1:1, fig. 3 – zdjęcie pulpy celulozowej rozcieńczonej wodą w stosunku 2:1.

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%), Na_2HPO_4 (0,27 w/v%), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (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%), Na_2HPO_4 (0,27 w/v%), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (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 mieszano na wytrząsarce typu worteks przez 5 minut. Otrzymane w ten sposób inokulum przenoszono na świeże podłoże produkcyjne oparte na glukozie i jej pochodnych (np. medium H-S o takim samym składzie jak podano powyżej). Hodowle produkcyjne prowadzono 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 warunkach stacjonarnych lub dynamicznych (mieszanych/wytrząsanych) 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. Następnie, celulozę homogenizowano z wykorzystaniem blendera i rozcieńczano wodą w stosunku wagowym 1:1. Następnie pulpę celulozową rozlewano na tace o wymiarach 10 x 10 cm, przenoszono do zamrażarki, inkubowano w temp. -18°C do momentu całkowitego zamrożenia (ok. 24 h) i liofilizowano.

Na podstawie pomiarów wykonanych wg normy *PN-EN 149+A1:2009 Sprzęt ochrony układu oddechowego. – półmaski filtrujące do ochrony przed cząstkami – wymagania, badanie, znakowanie* ustalono, że materiały na bazie BNC wytworzone metodą według wynalazku charakteryzowały się oporami przepływu powietrza wynoszącymi 0,10 kPa przy przepływie 35 L/min oraz 0,63 kPa przy przepływie 95 L/min.

Właściwości adsorpcyjne i filtracyjne materiałów na bazie BNC analizowano według normy *ISO 14683+AC:2019-09 Maski medyczne – Wymagania i metody badań. Wymagania i metody badań* względem bakterii patogennych różnicowanych po względem kształtów, rozmiarów oraz budowy ściany komórkowej: Gram dodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Gram ujemne pałeczki *Escherichia coli* ATCC 8739, a także grzyby *Candida albicans* ATCC 10231 oraz bakteriofaga *Pseudomonas phi6*, który ze względu na swój rozmiar i otoczkę białkową stanowi modelowy mikroorganizm rekomendowany w badania dotyczących wirusa SARS-CoV-2. Ustalono, że filtry na bazie BNC wykazywały właściwości adsorpcyjne na poziomie 75% względem bakterii *S. aureus* i *E. coli*, 63% względem drożdży *C. albicans* oraz 86% względem bakteriofaga phi6, natomiast skuteczność filtracji wynosiła 95% w przypadku *S. aureus* oraz *E. coli* i 100% w przypadku *C. albicans* oraz bakteriofaga phi6.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że otrzymaną pulpę celulozową rozcieńczano wodą w stosunku wagowym 2:1. W wyniku zastosowania niższego rozcieńczenia pulpy celulozowej, otrzymany materiał filtracyjny charakteryzował się skutecznością adsorpcji na poziomie 80% względem bakterii *S. aureus* i *E. coli*, 68% względem drożdży *C. albicans* oraz 90% względem bakteriofaga phi6. Skuteczność filtracji wynosiła 85% w przypadku *S. aureus* i *E. coli* i 100% w przypadku *C. albicans* oraz bakteriofaga phi6, natomiast opór powietrza wynosił 0,30 kPa przy przepływie 35 L/min oraz 1,44 kPa przy przepływie 95 L/min.

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że otrzymaną pulpę celulozową rozcieńczano z wodą w stosunku wagowym 1:2. W wyniku zastosowania większego rozcieńczenia pulpy celulozowej otrzymany materiał filtracyjny charakteryzował się skutecznością adsorpcji na poziomie 65% względem bakterii *S. aureus* i *E. coli*, 55% względem drożdży *C. albicans* oraz 70% względem bakteriofaga phi6. Skuteczność filtracji wynosiła 70% w przypadku *S. aureus* i *E. coli* i 90% w przypadku *C. albicans* oraz bakteriofaga phi6. Opór powietrza wynosił 0,07 kPa przy przepływie 35 L/min oraz 0,28 kPa przy przepływie 95 L/min.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie bionanocelulozy polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczepienie na podłożu płynnym Hestrin-Schramm zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oraz alkohol etylowy, bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter 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 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, **znamienny tym**, że tak otrzymaną celulozę homogenizuje się, rozcieńcza wodą w stosunku wagowym 1:1 albo 2:1 albo 1:2, następnie zamraża i poddaje procesowi liofilizacji.

Rysunki

1:2



Fig.1

1:1

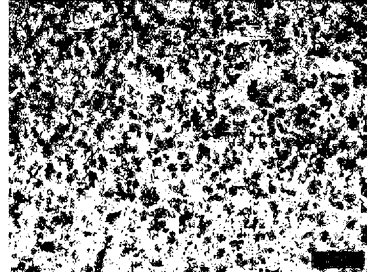


Fig.2

2:1



Fig.3