



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101611149 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 05

(21) 申请号 200780048887. X

(22) 申请日 2007. 08. 03

(30) 优先权数据

T02006A000932 2006. 12. 29 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 06. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2007/053063 2007. 08. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/081349 EN 2008. 07. 10

(73) 专利权人 梅迪斯蒂研究及生产股份有限公司

地址 意大利都灵

(72) 发明人 G·梅里兹

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 万雪松 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12P 19/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1840677 A, 2006. 10. 04,

W0 2005003366 A1, 2005. 01. 13,

Naoto Tongouchi, et al.. Increased Cellulose Production from Sucrose by Acetobacter after Introducing the Sucrose Phosphorylase Gene. 《Biosci. Biotechnol. Biochem. 》. 1998, 第 62 卷 (第 9 期), 1778-1780.

Kim Doman, et al.. Modification of Acetobacter xylinum Bacterial Cellulose Using Dextranase and Alternansucrase. 《J. Microbiol. Biotechnol. 》. 1999, 第 9 卷 (第 6 期), 704-708.

审查员 廖文勇

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

用于皮肤和组织损伤的基于纤维素的膜的生产方法

(57) 摘要

用于生产纤维素膜的方法,所述膜用于皮肤和组织损伤,比如疮、溃疡、烧伤、伤口等等的被覆,再生,修复和愈合,其中,所述方法通过在包含氮源和碳源的培养基中培养包括木醋杆菌物种的微生物;所述培养基还包含至少 1 种属于明串球菌属的微生物。

1. 用于生产纤维素膜的方法,所述膜用于皮肤和组织损伤的被覆,再生,修复和愈合,其中,所述方法通过在包含氮源和碳源的培养基中培养包括木醋杆菌物种的微生物,其特征在于所述培养基还包含至少 1 种酒明串珠菌的微生物。

2. 权利要求 1 所述的方法,所述皮肤和组织损伤为疮、溃疡、或伤口。

3. 权利要求 1 所述的方法,所述皮肤和组织损伤为烧伤。

4. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述培养基还包含选自酿酒酵母、稷酒裂殖酵母和 / 或苹果酸酵母的酵母。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养在 20℃ -36℃ 范围的温度和 1-6 范围的 pH 下实施。

6. 权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养在 26℃ -30℃ 范围的温度和 2-4 范围的 pH 下进行。

7. 前述权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养基包含蔗糖和 / 或蔗糖的液体提取物。

8. 前述权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养基包含乙酸作为 pH 调节剂。

用于皮肤和组织损伤的基于纤维素的膜的生产方法

[0001] 本发明涉及用于生产被覆和再生皮肤和组织损伤用途的基于纤维素的膜的生物技术方法以及由此获得的生物合成膜。

[0002] 特别地,本发明涉及的方法中,所述基于纤维素的膜借助于木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*) 细菌获得。

[0003] EP-A-0114481 记载了液体浸渍垫的生产,该液体浸渍垫用于伤口和烧伤用的药物处理,并由借助木醋杆菌培养而微生物地制造的纤维素膜制备。该工艺提供用于在静态条件(非搅拌培养)培养所述微生物;因此,在培养基的表面上培养所述细菌以形成连贯的膜,该膜通常具有 0.1mm 至大约 15mm 的厚度;将这样获得的膜从所述培养基移走,并用氢氧化钠处理以除去所述细菌,中和并用水洗涤以提供微生物纤维素的水浸膜。

[0004] W086/02095 也记载了纤维素膜的制备,该膜由木醋杆菌培养获得,用作人造皮肤移植;木醋杆菌培养物接种在含有氮和碳水化合物作为养料的培养基中,培养基在特定实施例中由添加了糖的中华茶(*TeaSinensis*) 的浸剂构成;该工艺包括在 28℃ 下培育所述微生物大约 36 小时的一段时期,之后,从所述培养基移走该膜并在室温下在支持体上以膨胀状态脱水。该专利是具有 BIOFILL 商标的市售药物的基础,其用于多种皮肤损伤的处理。

[0005] US 5846213 记载了具有类似于人类皮肤的弹性和机械性能的基于纤维素的药物的制备。借助于木醋杆菌的培养,预先制备了纤维素膜,然后将其溶解在包含二甲基乙酰胺和锂盐的溶剂系统中以获得溶液,借助于在胶凝浴中流延并凝结由该溶液获得纤维素膜。

[0006] 本发明的目的在于提供细菌制造的纤维素膜,及其生产方法,所述纤维素膜可用作皮肤损伤用的药物,并且有效创造有利于护理所述损伤的环境。

[0007] 另一目的在于提供纤维素膜,其具有适当的机械特性,特别是类似于人类皮肤机械性能的高弹性。

[0008] 因而,构成本发明目的是具有下述权利要求所界定特征的方法和结晶的基于纤维素的膜。

[0009] 特别地,本发明所述方法的特征在于,生物合成的基于纤维素的膜借助于在含有氮和碳源的培养基中,在至少 1 种属于明串球菌(*Leuconostoc*) 属的微生物存在下,培养属于木醋杆菌物种的微生物获得。

[0010] 在优选实施方案中,所述方法也通过将酵母接种在该培养基中来实施,酵母优选选自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),稷酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) 和 / 或苹果酸酵母(*Saccharomyces malidevorans*) 及它们之中的 2 或 3 种的混合物。

[0011] 醋杆菌属是革兰氏阴性、严格需氧的杆状细菌。其特征是可制造多链的化学等同于纤维素的聚- β -1,4-葡聚糖的能力。所述微纤丝形状的纤维素链在所述细菌表面在细胞膜外侧位置合成。在本发明所述的范围内,可使用在静置培养和搅拌培养条件中,都可生产纤维素微纤丝的任何木醋杆菌菌株,包括记载于 EP 0228779 中的特定菌株。

[0012] 所述明串球菌属包含球状细菌,其可通过气体的产生来区别于乳酸球菌属(genus *Lactococcus*)。明串球菌属的所有物种均具有异型发酵代谢作用;该细菌广泛分散于自然

界,尤其是蔬菜来源的底物上。它们具有 20℃ -30℃ 范围的最适生长温度,并较乳酸杆菌嗜酸程度低,优选弱酸性或中性底物,除了适应于酒的低 pH,且被称作酒的苹果乳酸发酵剂的酒明串珠菌 (*Leuconostoc oenos*) (最近被重新分类为 *Oenoscoccus oenos*)。

[0013] 基于申请人进行的检测,可以认为在木醋杆菌培养中,明串球菌属细菌的存在显著影响生物质的生产和增加。

[0014] 借助于本发明所述方法获得的膜基本上由结晶纤维素构成,且其特征在于,通常 250-400 范围的相对较低的平均聚合度。该膜的重要方面将其相对于传统结晶纤维素进行表征,在于其不溶于浓硫酸。该方面暗示在单独的纤维素链之间存在键合,其使得该产品不溶于浓硫酸并难以水解。

[0015] 在本发明所述的方法中,上述微生物的培养通常在 20℃ -36℃ 范围的温度下,和在 1-6 范围的 pH 下实施,优选为 26℃ -30℃ 的温度和 2-4 范围的 pH。

[0016] 优选的共生用培养基由蔗糖和 / 或蔗糖的液体提取物作为碳源和氮源构成。所述培养基还可包含蔗糖和乙酸。

[0017] 所述培养通常维持于静态条件下。

[0018] 借助于本身已知的技术从所述培养基分离所形成的膜,并通过干燥脱水。

[0019] 当该膜用生理溶液再水合时,其具有类似于完整人类皮肤的半透明度 (translucidity)、弹性和密度特性;其还具备有对水蒸汽和气体的选择通透性和对水和细菌的不透性。该膜具有优异的对伤处的粘附能力;产生的封闭保护伤口免于接触外界,防止污染,减少疼痛并创造理想微环境用于肉芽形成和上皮再形成。

[0020] 该膜特别推荐在 I 级直至深度 II 级的无过度渗出物的烧伤,溃疡和疮上使用;该膜完美地粘附于伤处并且惰性,无毒,无过敏且不含胶乳。

[0021] 实施例 1

[0022] 在 500L 的不锈钢容器中加入下列:250kg 的蔗糖提取物,20kg 的蔗糖和适量的以使该混合物 pH 为 3.5 的醋。然后在室温下用木醋杆菌和明串球菌属微生物特别是酒明串珠菌 (*Leuconostoc oenos*),以 30ml 总量,接种该培养基。在该方法过程中,借助于添加蔗糖和醋来调节 pH 并维持于 2.5。完成后洗涤并精制生物质直到获得液体状态(通过使用工业粉碎机);将这样获得的液体倾倒在棉支持体上并容纳于彼此连续相连并随后连接到真空系统上的不锈钢盒子中,其通过烘干液体部分来决定棉支持体上光滑且均匀的膜的形成。

[0023] 随后,将具有粘附膜的棉支持体放入烘箱,并且一旦干燥过程结束就将膜从该支持体上移除并送至保存。取决于液体生物质的数量和所用盒子的大小,可以获得不同大小和厚度的膜:例如,将液态的 750ml 生物质置入 23×30cm 大小的盒子中,可获得具有大约 0.05mm 厚度的 21×27cm 大小的膜。

[0024] 实施例 2

[0025] 在与上述相同的条件下重复实施例 1 的程序,除了使用上述细菌作为接种菌之外,还使用了酿酒酵母和稷酒裂殖酵母。

[0026] 对根据实施例 2 获得的膜进行分析以验证结构并测定纤维素含量。

[0027] 实施了以下分析。

[0028] i) 记录 FT-IR 光谱(配有金刚石皿 (diamond cell) 的 ASI React IR1000- 原样

样品分析 -4cm^{-1} 分辨率)。

[0029] 所记录的 IR 吸收信号是：

[0030] -3340cm^{-1} 的 OH 伸缩

[0031] -2984cm^{-1} 的 CH 脂族伸缩

[0032] $-1460-1200\text{cm}^{-1}$ 的 CH_2 变形, CH 和 CH_2 摇摆和面内 OH 变形

[0033] $-1100-1000\text{cm}^{-1}$ 的 CH_2O 和 CoC 伸缩

[0034] -897 和 663cm^{-1} 的纤维素特征谱带。

[0035] 因此,该 FT-IR 光谱对应于纤维素的光谱。

[0036] ii) 通过具备折射率探测器的 HPLC 方法分析总碳水化合物。

[0037] 所使用的方法为常用于测定纤维素和半纤维素含量的方法。

[0038] 根据米兰的 Stazione Sperimentale Carta Cartoni e Pasta per Carta(SSCCPC;纸、纸板和纸浆试验站)的内部方法测定纤维素含量,其中,多糖在浓硫酸中完全水解,然后测量总还原糖(Somogyi-Nelson 法),并通过酶法测定葡萄糖。

[0039] 根据半纤维素在稀硫酸中选择性水解,然后再测量总还原糖(Somogyi-Nelson 法)的 SSCPC 内部方法来测定半纤维素含量。

[0040] 所得结果(相对于分析样品干重表示为重量百分率)表明,所得膜在所采用的条件下不溶,该条件通常导致纤维素和半纤维素水解。

[0041] 样品所得结果如下：

[0042] -1.7% 的树脂物质,其可提取于环己烷/乙醇,

[0043] -75% 的不溶残渣,其是在水解于浓硫酸(72%),再用稀硫酸(3%)水解之后,或在通常可将纤维素和半纤维素水解成相应单糖的试验条件下,

[0044] -4.6% 的总还原糖,其针对水解溶质测定。

[0045] -1.8% 的葡萄糖(来源于纤维素),

[0046] -2.8% 的总还原糖(来源于半纤维素),

[0047] -85% 的不溶残渣,其是在 1M 的硫酸中水解通过使用 72% 和 3% 硫酸(通常允许将半纤维素选择性水解成相应的单糖的试验条件)的该 75% 的水解残渣之后。

[0048] -2.5% 的在残渣中的总还原糖,其通过在 1M 的硫酸中水解得到(来源于半纤维素)。

[0049] 为了更好的界定膜的真实化学结构,在固态下通过核磁共振进行了分析。 ^{13}C 原子核的光谱通过 DD CP-MAS(双极去耦交叉-极化魔角旋转)技术来记录。

[0050] 这种类型的技术是减低双极耦合,因而是减少信号带宽,在高功率下去耦并将样品围绕相对于固定轴转移 $54^\circ 7'$ 角度(被称为魔角)的轴旋转所必须的。后者有利于消除双极和同核相互作用以及化学位移各向异性。特别地,所述 DD CP-MAS 技术用于增强稀释核的信号强度并且消除与这些相同核的过长弛豫时间相关的问题。

[0051] 在本实验中,利用了大量的核的自旋极化,例如,比如相对较强的氢核,以用来增强稀释核例如 ^{13}C 的自旋极化。

[0052] 测量使用具有 4mm 探针的 As x 300Bruker 仪器,通过使样品在 8kHz 速度下旋转来进行。

[0053] 由 NMR 谱图结果可知,光谱分布具有纤维素的糖苷重复单元的典型信号,该分布

结果类似于从醋杆菌属获得的纤维素 I 的分布结果。

[0054] 而且,从完全的结晶 C_4 和无定形 C_4 , 获得的结晶百分数为约 75%, 因而是足以判断为高结晶度指数的值; 在又一系列的检测中, 结晶度百分数测定为 65% -90% 的范围。

[0055] 平均聚合度使用粘度测量方法 UNI 8282/94 来测量。将样品完全溶于所用溶剂(铜乙二胺), 平均聚合度为 290。