

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245210 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433327**

(22) Data zgłoszenia: **2020.03.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.09.27 BUP 26/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.03 WUP 23/2024**

(51) MKP:

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,
Szczecin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:
**KAROL FIJAŁKOWSKI, Szczecin, PL
DARIA CIECHOLEWSKA, Szczecin, PL
MICHAŁ BRODA, Dobrze, PL**

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Justyna Zatorska, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

**Sposób otrzymywania inokulum do wytwarzania celulozy bakteryjnej oraz sposób
wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem pożywki pochodzenia roślinnego**

PL 245210 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania inokulum do wytwarzania celulozy bakteryjnej i sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem pożywki na bazie produktów pochodzenia roślinnego, przez bakterie z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter xylinus* na drodze hodowli stacjonarnej lub mieszanej, jako pełnowartościowej pożywki hodowlanej i/lub produkcyjnej.

Celuloza bakteryjna (CB) wytwarzana przez drobnoustroje jest chemicznym analogiem celulozy roślinnej, czyli polisacharydem zbudowanym z jednostek β , D-glukopiranozy połączonych ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Jednak w przeciwieństwie do celulozy roślinnej należy do wysokokrystalicznych celuloz, bogatych we frakcję α . Biopolimer ten jest produkowany przez Gram-ujemne, tlenowe bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Proces biosyntezy tego polisacharydu prowadzony przez drobnoustroje na drodze fermentacji obejmuje 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.

Celuloza wytwarzana przez drobnoustroje znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i dziedzinach nauki, w tym w medycynie, na przykład jako materiał opatrunkowy lub nośnik dla substancji bioaktywnych o właściwościach antymikrobiologicznych w terapii zakażonych, przewlekłych i trudno gojących się ran.

Przemysłowy proces biosyntezy CB prowadzony jest najczęściej w warunkach hodowli stacjonarnej, w których polisacharyd ten jest syntetyzowany w postaci silnie uwodnionej, elastycznej membrany na powierzchni płynnej pożywki hodowlanej. Inne metody to hodowla mieszana lub mieszana. Wybór metody hodowli jest ściśle powiązany z dalszym przeznaczeniem CB. Uzyskany w ten sposób materiał posiada specyficzną nanostrukturę złożoną z gęsto usieciowanych fibryli, ponadto cechuje się wysokim stopniem krystaliczności (>60%), oraz brakiem chemicznych zanieczyszczeń takich jak lignina czy hemiceluloza.

Zalety CB, takie jak: wysoka wytrzymałość mechaniczna, elastyczność, łatwość produkcji i oczyszczania, biokompatybilność, nietoksyczność czy wysoka chłonność sprawiły, że znalazła ona zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i dziedzinach nauki, w tym m.in. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, papierniczym, tekstylnym, elektronicznym, czy w medycynie.

Wykorzystanie CB w medycynie, szczególnie jako materiał opatrunkowy, implanty, stenty czy sztuczne naczynia krwionośne jest możliwe i ściśle skorelowane z takimi jej właściwościami jak wysoka czystość, zgodność z żywymi tkankami, elastyczność, wytrzymałość mechaniczna, wysoka zdolność chłonięcia i utrzymywania cieczy, w tym syntetycznych lub naturalnych substancji biologicznie aktywnych. CB stosowana jako opatrunek na rany pozwala na utrzymanie wilgotnego środowiska, optymalnego dla procesów gojenia, przy jednoczesnym zapewnieniu ochrony przed mikroorganizmami z otoczenia. Dodatkowymi korzyściami wynikającymi ze stosowania tego biomateriału jest jego pełna biodegradowalność, łatwość w zastosowaniu i przechowywaniu oraz możliwość termicznej sterylizacji. 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 stosowanej pożywki (różne źródła węgla i azotu). Parametry końcowe produktu decydują o możliwościach jego zastosowania.

W opisach patentowych PL 171952, PL 190961 ujawniono sposób wytwarzania CB w postaci błon na drodze hodowli stacjonarnej bakterii *Acetobacter xylinum*. Uzyskany biomateriał przedstawia się jako użyteczny w zastosowaniach biomedycznych – jako środki opatrunkowe w chirurgii i dermatologii.

Znane jest z opisu patentowego PL 185337 sposób polegający na zaszczepieniu bakterii *Acetobacter xylinum* na podłożu zawierającym glukozę jako źródło węgla i inkubacji w temperaturze 30° przez 40 – 48 godzin. W drugim etapie mieszano pożywkę z utworzoną na jej powierzchni błoną i tak otrzymane inokulum w ilości 5 – 10% wagowych podłoża, zaszczepiano na pożywce zawierającej 30 części wagowych sacharozy. Zastosowanie tej metody pozwala na uzyskanie wysokokrystalicznej α -celulozy

bakteryjnej, o czystości wynoszącej ~97% i stopniu polimeryzacji 2000 – 6000 oraz cechującej się wysoką jednorodnością i gęstością powierzchniową ($22 - 24 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Z opisu patentowego PL 216180 znany jest sposób wytwarzania bionanocelulozy przy użyciu bakterii *Glucanacetobacter xylinus* E₂₅ przechowywanych jako liofilizat z 5 – 15% odtłuszczonego mleka lub glicerolu, z których przygotowuje się inokulum do zaszczepienia pożywki hodowlanej zawierającej glukozę jako źródło węgla. W efekcie otrzymuje się CB o wysokich właściwościach adhezyjnych, korzystną do zastosowania jako wyroby medyczne i dermatologiczno-kosmetyczne – czyste, wilgotne, suszone, liofilizowane, lub wysycane substancjami czynnymi i/lub pomocniczymi.

W opisie patentowym PL 216702 przedstawiono sposób wytwarzania wysoce elastycznej, sprężystej CB o właściwościach chrząstki, przeznaczonej na implanty dla chirurgii rekonstrukcyjnej. W tym celu prowadzono hodowlę stacjonarną bakterii *Glucanacetobacter xylinus* prowadzonej w płaskim bioreaktorze lub w rurkach polietylenowych. Po usunięciu cieczy pohodowlanej i oczyszczeniu, celulozę modeluje się w konstrukcję przestrzenną o pożądanym 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 ustabilizowania się pH. Uzyskany w ten sposób biomateriał cechuje minimalna sorpcja płynów ustrojowych, biokompatybilność i hipoalergiczność.

W opisie patentowym US 2009/0017506 omówiono otrzymywanie CB z zastosowaniem *Acetobacter xylinum* w reżimie ciągłym (bez konieczności wymiany pożywki hodowlanej po jednym cyklu). Fermentacja była prowadzona w czasie 24 – 456 h zapewniając gramaturę błon celulozowych na poziomie $6 - 240 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$.

Znane są również z patentów WO86/02095A1, A-120 159/85 i GB231701 sposoby wytwarzania CB na drodze hodowli statycznej i mieszanej z wykorzystywaniem bakterii *Acetobacter xylinum* w temperaturze $20 - 28^\circ\text{C}$ w czasie od kilku godzin do kilkunastu dni w pożywce hodowlanej zawierającej fruktozę, glukozę, sorbitol lub mannitol jako źródło węgla. Otrzymana CB charakteryzuje się właściwościami umożliwiającymi zastosowanie tego polimeru jako opatrunku medycznego lub sztucznej skóry.

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 5144021 znany jest także sposób produkcji CB na drodze hodowli dynamicznej prowadzonej w fermentorze w temperaturze 30° przy pH w zakresie 4,5 – 5,5, przy zastosowaniu glukozy, fruktozy, lub mono i disacharydów pochodzących z hydrolizatów drewna jako źródła węgla.

Metody produkcji CB zostały opisane również w patentach CN 101700408 (produkcja modyfikowanych, wysokokrystalicznych opatrunków hydrożelowych z udziałem szczepu *G. xylinus*), CN 10191626 (proces produkcji błon celulozowych z zastosowaniem tolerującego niskie pH pożywki szczepu *Glucanacetobacter* sp. S.C.-01 mogącego znaleźć zastosowanie w produkcji na skalę przemysłową), CN 10168167 (proces produkcji błon celulozowych z zastosowaniem tolerującego niskie temperatury szczepu *Glucanacetobacter xylinus* 323). Sposoby syntezy CB są podane również w następujących opisach patentowych: US 5975095, US 5962278, US 6110712, US 6429002, US 6329192, US 5144021, US 5079162, US 4863565, US 5955325, US 4788146, US 4588400, US 7390499 B2, EP 0792935, EP0200409, WO 8602095.

Manipulacja warunkami hodowli CB może zaowocować uzyskaniem CB o odmienionych właściwościach fizykochemicznych. Modyfikacjom może podlegać również skład pożywki hodowlanej lub/i pożywki produkcyjnej. Pożywki stosowane w mikrobiologicznych procesach wytwarzania mogą być zdefiniowane chemicznie, co oznacza, że tworzą je substraty o znanych stężeniach. Pożywki niezdefiniowane składają się z komponentów pochodzenia naturalnego o nieznanym stężeniu. Proces wytwarzania CB przeprowadza się najczęściej z użyciem pożywek zawierających takie składniki jak cukier (glukoza, fruktoza, sacharoza, mannitol) jako źródło węgla, związki kompleksowe zawierające azot, oraz źródła witamin takie jak ekstrakt drożdżowy, czy pepton. Standardową pożywką zdefiniowaną chemicznie, używaną do hodowli mikroorganizmów syntetyzujących celulozę jest pożywka Hestrin-Schramm (H-S), zawierająca w swoim składzie 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%). Nie jest to jednak jedyna dostępna komercyjnie pożywka. Wyróżnia się również pożywkę HSA zawierającą

w swoim składzie kwas askorbinowy, pożywkę Hassid-Barker (HB), pożywki YPD, GYB, AHS, Yamana, Zhou, Son, Park, M1A05P5, CSL z fruktozą, pożywkę fermentacyjną FM, buforowaną octanem (AB) i inne. Składniki większości z tych pożywek są drogie, dlatego ich wykorzystanie do produkcji CB w skali przemysłowej jest ekonomicznie niekorzystne i znacząco wpływa na koszt wytworzenia tego biomateriału.

Pożywka jest najważniejszym czynnikiem wpływającym najbardziej znacząco na koszt procesu produkcji CB, a tym samym na ostateczną cenę tego biomateriału jako produktu w przemyśle. Szacuje się, że koszt pożywki produkcyjnej stanowi 50 – 65% całkowitych wydatków w procesie fermentacyjnym. Zatem kluczowym aspektem w syntezie tego biopolimeru jest opracowanie taniej pożywki produkcyjnej, która dodatkowo powinna umożliwić zwiększenie efektywności procesu biosyntezy CB, co doprowadzi do stworzenia ekonomicznie korzystnego rozwiązania do zastosowania w szerokim zakresie dziedzin nauki i przemysłu.

Jako surowce do produkcji pożywki można rozpatrywać wszelkiego rodzaju warzywa, owoce, czy ekstrakty roślinne. Mogą stanowić one tanie źródło substancji odżywczych dla bakterii. Jednak w ostatnim dziesięcioleciu, na tle poważnych globalnych problemów środowiskowych, gospodarczych i energetycznych, podnosi się również znaczenie zrównoważonego wykorzystania odpadów przemysłowych. Naukowcy, wykorzystując postępy w technikach biotechnologicznych i obecne podejście do „czystych” technologii koncentrują się na zwiększeniu wykorzystania odpadów rolnych i przemysłowych jako nowych źródeł odżywczych dla bakterii syntetyzujących celulozę. Oprócz taniej i wydajnej produkcji CB, ma to również na celu uczynienie tego przemysłu bardziej ekologicznym (poprzez gospodarowanie odpadami i oczyszczanie środowiska), a całą technologię produkcji bardziej „zieloną”. Połączenie technologii wytwarzania CB z wykorzystaniem surowców stanowiących produkty uboczne przemysłu stanowi korzyść dla obu tych gałęzi, wynikającą również z rosnącej świadomości ekologicznej i zapotrzebowania na tego typu rozwiązania.

Wiele publikacji naukowych oraz opisów patentowych podnosi tematykę wykorzystania różnych naturalnych surowców do produkcji CB, najczęściej jako źródła węgla. Jednak w większości tych doniesień nie rezygnuje się z zastosowania innych składników będących komponentami standardowej pożywki H-S, takich jak np. ekstrakt drożdżowy. Jako przykład, Kurosumi i in. zbadali możliwość skutecznej produkcji CB z różnych soków owocowych (z wykorzystaniem owoców odpadowych), w tym z pomarańczy, ananasa, jabłka, winogron i japońskiej gruszki, otrzymując dobrą efektywność procesu biosyntezy CB jedynie w przypadku dodania źródeł azotu (takich jak ekstrakt drożdżowy).

Lima i in. zoptymalizowali metodę pozyskiwania CB w hodowli statycznej z użyciem soku z agawy sizalowej (pozostałości agroindustrialnej) jako substratu do wytworzenia pożywki suplementowanej dodatkowo cukrami i ekstraktem drożdżowym.

W opisie patentowym CN 102250983A przedstawiono metodę wydajnej produkcji CB przy użyciu soku z topinamburu poddanego również suplementacji dodatkiem siarczanu amonu jako źródło azotu.

Patent WO 2016/029432 A1 ujawnia sposób wytwarzania CB przy użyciu odpowiednio spreparowanych wyłoczyn z manioku tak, aby uzyskać hydrolizat do wstępnej fermentacji, czyli zaszczepienia pierwszą populacją mikroorganizmów, otrzymując preinokulum. Kolejne etapy obejmują przygotowanie pożywki produkcyjnej i zaszczepienie jej drugą populacją mikroorganizmów w celu wytworzenia celulozy bakteryjnej.

Surowce poprzemysłowe, które mogą być wykorzystane jako źródło substancji odżywczych to najczęściej odpady przemysłu browarniczego, cukierniczego, przetwórstwa warzyw i owoców, oraz szeroko pojętego rolnictwa. W tym przypadku również często stosuje się suplementację organicznymi, lub nieorganicznymi źródłami azotu, aby podnieść wartość odżywczą uzyskanej pożywki.

W patencie WO2008156227A1 ujawniono sposób wytwarzania CB z wykorzystaniem pożywki na bazie drożdżowej cieczy odpadowej pozyskanej w trakcie produkcji piwa. W ten sposób znacznie obniżono koszty otrzymywania CB, która w późniejszym etapie miała posłużyć jako podstawowy surowiec do produkcji żelowych masetek kosmetycznych.

Revin i in. (2018) opracowali sposób obniżenia kosztów syntezy CB poprzez zastosowanie produktów ubocznych przemysłu alkoholowego i mleczarskiego, bez wstępnej obróbki czy dodatkowych źródeł azotu. Autorzy Ci wykazali, że zastosowanie wywaru pszennego lub serwatki pozwala na otrzymanie nawet 3-krotnie większego uzysku CB po 3 dniach hodowli, w porównaniu z CB hodowaną w pożywce H-S.

Patent CN102168056B ujawnia sposób produkcji CB przy użyciu wyłoków cytrusowych jako surowca. Metoda według tego wynalazku w celu pozyskania bulionu fermentacyjnego wymaga jednak specyficznej obróbki surowcowej z użyciem drożdży.

Kongruang i in. (2008) zaproponowali z kolei sposób obniżania kosztów produkcji CB poprzez zastosowanie soków kokosowego i ananasowego bogatych w białka, węglowodany, oraz mikroelementy. Pożywki te musiały zostać jednak suplementowane dodatkowo ekstraktem drożdżowym i etanolem.

Li i in. (2015) badali również możliwość zastosowania do produkcji CB ścieków z przemysłu przetwórczego kandyzowanej jujuby (inaczej głożyny pospolitej – owocu występującego na południu Europy i w Azji). Wyniki ich badań wykazały, że woda poprodukcyjna z przemysłu jujuby stanowi tani i obfity surowiec, który można łatwo zhydrolizować aby uzyskać glukozę poprzez wstępną obróbkę kwasem siarkowym. 3-godzinna hydroliza w 80°C zapewniała wyższą aż o 58% zawartość glukozy w surowcu, co pozwalało na osiągnięcie wyższej efektywności procesu biosyntezy CB podczas 6 dni hodowli *Gluconacetobacter xylinus*.

W 2019 roku ukazała się publikacja naukowa przedstawiająca obecny stan wiedzy na temat produkcji CB z wykorzystaniem niskokosztowych pożywek, ze szczególnym uwzględnieniem odpadów z przemysłu rolno-spożywczego, spożywczego, browarniczego, cukrowniczego, biorafinerii lignocelulozowych, zakładów włókienniczych i celulozowych (publikacja: Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911). Ponadto, omawiane są w niej również najnowsze trendy badawcze i dostępne obecnie komercyjne pożywki do produkcji CB. Autorzy podnoszą temat wykorzystania odnawialnych źródeł węgla poprzez optymalizację bioprocessów, minimalizując w ten sposób użycie drogich pożywek komercyjnych, oraz niską wydajność w skali przemysłowej. Zwracają oni uwagę, że konwersja odpadów i produktów ubocznych przemysłu przez mikroorganizmy pomoże w osiągnięciu jednego z celów ONZ, jakim jest zrównoważony rozwój poprzez odpowiedzialną produkcję i konsumpcję. W opracowaniu tym, autorzy przytaczają prace, w których do produkcji pożywek wykorzystuje się surowce wymagające wstępnej obróbki, np. hydrolizat z łodyg kukurydzy (Cheng i in., 2017), łuskę ryżową (Goelzer i in., 2009) czy hydrolizaty pszenne, w przypadku których efektywność procesu biosyntezy była nawet o 60% wyższa w odniesieniu do pożywek ze standardowym źródłem węgla, np. glukozą (Hong i in., 2011). Innym odpadem rolniczym który był wykorzystywany w tym celu są skórki owoców i warzyw bogate w cukry redukujące, witaminy, białka i różne kwasy. Badano zastosowanie skórki bananowej w kombinacji z różnymi stężeniami glukozy uzyskując wyniki sugerujące, że skórka ta może częściowo zastąpić konwencjonalne źródła azotu i węgla w produkcji CB (Adnan, 2015). Znane są również efekty wykorzystania suszonych odpadów ze skórek pomarańczowych otrzymywanych podczas przetwórstwa owoców na soki, składających się z cukrów, pektyny, celulozy i hemicelulozy. Wstępna obróbka enzymatyczna pozwoliła na zwiększenie stężenia cukrów fermentowalnych, otrzymując w efekcie zwiększenie produkcji CB od 4 do 6 razy. Ponadto, stwierdzono różnice strukturalne w odniesieniu do celulozy syntetyzowanej w tradycyjnej pożywce H-S – fibryle były grubsze, oraz gęściej upakowane (Kuo i in. 2017).

Alternatywne źródło węgla może stanowić melasa pozyskana w przemyśle cukierniczym, pozwalając na wydajną produkcję CB o właściwościach fizykochemicznych odpowiadających celulozie pozyskanej według powszechnie znanych metod (Keshk, Sameshima 2006). CB otrzymywana z pożywek na bazie melasy i trzciny cukrowej jest ponadto opisywana jako nie wykazująca genotoksyczności czy cytotoksyczności związanej z użyciem surowców odpadowych, co czyni ją potencjalnym materiałem do wielu zastosowań biomedycznych.

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) to gatunek rośliny należący do rodziny psiankowatych (*Solanaceae*) pochodzący z Ameryki Południowej i przywieziony do Europy pod koniec XVI wieku. Ziemniak jest popularnym warzywem w Polsce, charakteryzującym się wysokim spożyciem. Technologiczne wykorzystanie ziemniaka wiąże się przede wszystkim z produkcją skrobi. Udział ziemniaków w całkowitej produkcji skrobi w Unii Europejskiej wynosi około 20%. Skrobię ziemniaczaną charakteryzuje niska zawartość zanieczyszczeń, co daje jej przewagę nad skrobią zbożową. Produktem ubocznym powstającym w czasie produkcji skrobi ziemniaczanej jest sok komórkowy uwolniony z bulw ziemniaka w trakcie oddzielania miazgi ziemniaczanej przy pomocy wirówek miazgowych. Sok ten jest uznawany jako odpad ciężki do zagospodarowania (do biodegradacji potrzebne są duże ilości tlenu). W ostatnich latach sok z bulw ziemniaka, po wyizolowaniu frakcji białkowej, jest stosowany w żywieniu zwierząt, natomiast surowy sok z bulw ziemniaka zyskał popularność jako środek do łagodzenia objawów choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy lub innych problemów w obrębie układu trawiennego. Sok komórkowy z bulw

ziemniaków to produkt odpadowy uzyskiwany w przemyśle skrobiowym. Składa się on zarówno z minerałów (1%) jak i substancji organicznych (4%) – przede wszystkim białek (2%). Pozostałe substancje organiczne to głównie witaminy – B1, B2, B6, PP, C i E. Ilości poszczególnych składników mogą się istotnie różnić w zależności od odmiany, oraz warunków uprawy ziemniaka.

Nieoczekiwanie okazało się, że można wykorzystać sok z bulw ziemniaków do otrzymywania pożywki do wytwarzania celulozy bakteryjnej.

Sposób otrzymywania inokulum do wytwarzania celulozy bakteryjnej, według wynalazku, z wykorzystaniem pożywki pochodzenia roślinnego, polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczerpienie w płynnej wysterylizowanej pożywce hodowlanej bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, następnie mieszaniu przez 15 min i inkubacji przez 3 – 10 dni w temperaturze 25 – 30°C i ponownym mieszaniu przez 5 min w celu uwolnienia do pożywki komórek bakteryjnych, charakteryzuje się tym, że jako pożywkę hodowlaną stosuje się, pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1 – 1:3.

Sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej polegający na przeniesieniu inokulum w ilości 5 – 20% objętościowych do wysterylizowanej pożywki produkcyjnej, prowadzeniu procesu produkcyjnego przy pH w zakresie 4,0 – 6,0, w temperaturze 25 – 30°C przez okres 3 – 20 dni, charakteryzuje się tym, że jako pożywkę produkcyjną stosuje się pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1 – 1:3.

Korzystnie stosuje się inokulum, w którym jako pożywkę hodowlaną stosuje się pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1 – 1:3. Można jednak stosować także inokulum bakteryjne przygotowane w innej pożywce hodowlanej lub według innego znanego sposobu.

Korzystnie do pożywki produkcyjnej przed przeprowadzeniem procesu fermentacji dodaje się alkohol etylowy w ilości 0,5 – 1,5 v/v%.

Hodowlę produkcyjną prowadzi się w warunkach stacjonarnych lub mieszania, przy szybkości obrotów 110 – 160 rpm.

Korzystnie stosuje się sok komórkowy z bulw ziemniaków o składzie 0,2 – 1,0 mg/mL białka oraz 8 – 40 mg/mL cukrów.

Sposób według wynalazku, dzięki zastosowaniu pożywki wytworzonej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków pozwala na wytworzenie CB przy znacznie niższym nakładzie finansowym w porównaniu do standardowych, najczęściej stosowanych do produkcji CB pożywek mikrobiologicznych na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego, np. pożywki Hestrin-Schramm. Sok komórkowy z bulw ziemniaków może być pozyskiwany na potrzeby produkcji pożywki, z zastosowaniem sokowirówek lub wirówek miazgowych podobnych do tych, które stosowane są w przemyśle krochmalniczym. W takim wypadku koszt wyprodukowania 1000 L pożywki opartej o sok z bulw ziemniaków wiąże się z użyciem 1600 – 2000 kg ziemniaków (po obraniu 1200 – 1500 kg) i wynosi ok. 800 – 1200 zł (zakładając, że cena ziemniaka za 100 kg wynosi 50 – 60 zł wg danych Głównego Urzędu Statystycznego). Dla porównania koszt wyprodukowania 1000 L pożywki na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego, np. podłoża Hestrin-Schramm, nie uwzględniający zużycia wody waha się w przedziale od ok. 5300 zł do ok. 7500 zł, w zależności od producenta składników pożywki.

Sok komórkowy z bulw ziemniaków może być pozyskiwany z procesu technologicznego produkcji krochmalu, w którym stanowi odpad organiczny powstający w wyniku oddzielania miazgi ziemniaczanej przy pomocy wirówek miazgowych. Utylizacja odpadów przemysłu skrobiowego stanowi poważny problem technologiczny, ponieważ charakteryzują się one wysokim wskaźnikiem chemicznego i biologicznego zapotrzebowania na tlen przy jednocześnie wysokim uwodnieniu. Jednak w świetle obowiązującego w Polsce prawa, wytwórcy odpadów przemysłowych zobowiązani są znaleźć odpowiedni sposób ich zagospodarowania. Zaletą zastosowania pożywki sporządzonej według wynalazku jest także utrzymanie efektywności procesu biosyntezy CB (mierzonej jako mokra masa oczyszczonej CB na 1 L pożywki produkcyjnej) przynajmniej na poziomie jak w przypadku zastosowania konwencjonalnych pożywek na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego. Ponadto, CB uzyskiwana w procesie prowadzonym z zastosowaniem pożywki według wynalazku cechuje się czystością oraz równie dobrymi właściwościami fizykochemicznymi jak CB uzyskana z wykorzystaniem standardowych pożywek na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego. Podobnie jak CB uzyskana z wykorzystaniem standardowych pożywek na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego, uzyskany materiał nie wykazuje efektu cytotoksycznego względem hodowli komórek eukariotycznych *in vitro*. Zastosowanie soku komórkowego z bulw ziemnia-

ków jako źródła cennych składników odżywczych dla bakterii z rodzaju *Komagataeibacter xylinus* pozwala na zaprojektowanie ekonomicznie korzystnego procesu biosyntezy CB, która jest biopolimerem bardzo pożądanym w wielu gałęziach przemysłu i dziedzinach nauki. Ponadto, zastosowanie soku z bulw ziemniaków jako pożywki hodowlanej i produkcyjnej wiąże się z pełnym bezpieczeństwem aplikacyjnym, gdyż pozwala zachować biokompatybilność i nietoksyczność uzyskiwanej celulozy, nie zanieczyszczając jej żadnymi substancjami o negatywnym wpływie.

Sposób według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania.

Przykład 1

Przed rozpoczęciem procesu fermentacyjnego prowadzącego do syntezy CB, przygotowano inokulum wykorzystując bakterie *Komagataeibacter xylinus*, którymi zaszczepiano pożywkę hodowlaną przygotowaną według poniższej procedury:

Bulwy ziemniaków pozbawiono skórki i rozdrobniono z wykorzystaniem sokowirówki wysokoobrotowej (w celu uzyskania 1 L pożywki, przerobiono ok. 1,8 kg ziemniaków). Uzyskany sok odstawiono na 30 min, aby zawarta w nim skrobia osadziła się na dnie naczynia w postaci białego osadu. Po tym czasie sok zdekantowano znad skrobi do oddzielnego naczynia i rozcieńczono wodą destylowaną w proporcji objętościowej 1:1 tak, że finalnie zawierał on 0,5 mg/mL białka, oraz 20 mg/mL cukrów. Tak przygotowaną pożywkę sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 20 min, a następnie oddzielono części stałe w celu otrzymania klarownej pożywki.

Przygotowane inokulum bakteryjne przenoszono do pożywki produkcyjnej (w ilości 10% objętościowych pożywki) przygotowanej w sposób opisany powyżej, analogiczny jak w przypadku pożywki hodowlanej. Hodowlę produkcyjną prowadzono w naczyniach laboratoryjnych z plastiku, szkła lub stali nierdzewnej, wyposażonych w pokrywki umożliwiające swobodną wymianę gazową z otoczeniem, np. wyposażone w filtry membranowe z porami o średnicy 0,22 µm, w warunkach stacjonarnych, przez 7 dni w temperaturze 28°C.

W celu obliczenia efektywności procesu biosyntezy CB (uzysku otrzymanej celulozy) prowadzonego w warunkach hodowli stacjonarnej lub mieszanej, oraz oceny właściwości fizykochemicznych tego biomateriału, uzyskanego na drodze biosyntezy w warunkach stacjonarnych przez 7 dni w 28°C, otrzymane błony CB oddzielano od pożywki, ważono i oczyszczano za pomocą wodnego roztworu NaOH w 80°C przez 90 min, po każdym 30 min wymieniając ten roztwór na świeży. Po tym czasie CB przenoszono do czystych pojemników i płukano w wodzie destylowanej, do momentu ustabilizowania się pH na poziomie 6,5 – 7,5 (przez okres 72 h), po czym błony CB ponownie ważono.

W kolejnym etapie wykonywano podstawową charakterystykę właściwości fizykochemicznych błon CB. Właściwości CB uzyskanej z wykorzystaniem pożywki produkcyjnej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków porównywano do właściwości CB pozyskanej przy użyciu konwencjonalnej pożywki hodowlanej na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego (pożywka H-S 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·H₂O (0,05 w/v%)).

W tabeli 1 zestawiono wartości parametrów dla CB syntetyzowanej w pożywce H-S i pożywce sporządzonej według wynalazku.

Efektywność procesu biosyntezy CB prowadzonego w warunkach hodowli stacjonarnej przez 7 dni w 28°C z użyciem pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków mierzona jako uzysk CB g/L pożywki była większa o około 10% w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnej pożywki H-S i wynosiła około 80 g/L (w przypadku zastosowania pożywki H-S – około 70 g/L).

Analizy właściwości związanych z pochłanianiem i uwalnianiem cieczy wykazały, że właściwości CB syntetyzowanej z użyciem soku z bulw ziemniaka były zbliżone do właściwości CB wytworzonej z użyciem standardowej pożywki (nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy uzyskiwanymi wynikami). Podobieństwa dotyczyły parametrów takich jak: współczynnik pochłaniania wody (SR – ang. *swelling ratio*) mierzony po 24 h inkubacji w wodzie destylowanej, współczynnik utrzymywania cieczy (WHC – ang. *water holding capacity*), oraz wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV – ang. *water retention value*) obliczanych na podstawie pomiaru masy podczas suszenia CB na wagosuszarce w 60°C. Uzyskana według wynalazku CB nie wykazywała również właściwości cytotoksycznych, co potwierdzono testami toksyczności względem komórek fibroblastów (Tab. 1).

Sposób obliczania 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 obliczania 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.

Tabela 1

	pożywka H-S	pożywka według wynalazku
SR [%] po 24 h	298,59 ± 33,14	275,12 ± 43,01
WHC [%] po 6 min	275,13 ± 36,21	283,93 ± 32,01
WRV [%] po 6 min	13,41 ± 4,52	15,35 ± 6,25
żywołność komórek [%]	98,67 ± 5,02	99,99 ± 4,14

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że do pożywki produkcyjnej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, przed przeprowadzeniem procesu fermentacji dodawano alkohol etylowy w ilości 1,0 v/v%, jako czynnik stresogenny, w celu stymulacji komórek bakteryjnych *K. xylinus* do produkcji celulozy. Efektywność procesu biosyntezy CB prowadzonego w warunkach hodowli stacjonarnej przez 7 dni w 28°C z użyciem pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków wzbogaconej alkoholem etylowym, mierzona jako uzysk CB (g/L pożywki) była większa o około 30% w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnej pożywki H-S, wzbogaconej tą samą ilością alkoholu etylowego i wynosiła około 180 g/L (w przypadku zastosowania pożywki H-S – około 140 g/L). Dodatek etanolu nie zmieniał właściwości uzyskanego biomateriału w porównaniu do biomateriału uzyskanego z wykorzystaniem konwencjonalnej pożywki H-S.

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że hodowla bakterii syntetyzujących CB po zaszczeniu pożywki produkcyjnej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków inokulum stanowiącym 10% objętościowych pożywki prowadzona była w warunkach mieszania. W tym celu pożywkę produkcyjną przygotowaną według wynalazku rozlewano do naczyń produkcyjnych, np. szklanych kolb, zaszczepia przygotowanym, metodą według wynalazku inokulum i inkubuje w temperaturze 28°C przez 4 dni w inkubatorze z mieszaniem. Szybkość obrotów wynosiła 130 rpm. W wyniku ciągłego działania sił ścinających i siły odśrodkowej, CB formowana była w kształcie kulek których wielkość można kontrolować za pomocą doboru szybkości obrotów oraz ilości dodawanego inokulum. Efektywność procesu biosyntezy CB prowadzonego w warunkach hodowli mieszanej przez 3 dni w 28°C z użyciem pożywki

na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków mierzona jako uzysk CB (g/L pożywki) była większa o około 10% w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnej pożywki H-S i wynosiła około 70 g/L (w przypadku zastosowania pożywki H-S – około 65 g/L).

Przykład 4

Sposób jak w przykładzie trzecim, z tym, że do pożywki hodowlanej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, przed przeprowadzeniem procesu fermentacji dodawano alkohol etylowy w ilości 1,0 v/v%. Efektywność procesu biosyntezy CB prowadzonego w warunkach hodowli mieszanej przez 4 dni w 28°C z użyciem pożywki na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków wzbogaconej alkoholem etylowym, mierzona jako uzysk CB (g/L pożywki) była większa o około 15% w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnej pożywki H-S i wynosiła około 120 g/L (w przypadku zastosowania pożywki H-S – około 105 g/L).

Przykład 5

Przygotowano inokulum przy użyciu konwencjonalnej pożywki hodowlanej na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego (pożywka H-S 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%).

Przygotowane inokulum bakteryjne przenoszono do pożywki produkcyjnej (w ilości 10% objętościowych pożywki) przygotowanej w sposób jak w przykładzie pierwszym. Hodowlę produkcyjną prowadzono również w sposób jak w przykładzie pierwszym. Efektywność procesu biosyntezy CB mierzona jako uzysk CB (g/L pożywki), była na podobnym poziomie jak w przykładzie pierwszym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania inokulum do wytwarzania celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem pożywki pochodzenia roślinnego, polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczerpienie w płynnej wysterylizowanej pożywce hodowlanej bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, następnie mieszaniu przez 15 min i inkubacji przez 3 – 10 dni w temperaturze 25 – 30°C i ponownym mieszaniu przez 5 min w celu uwolnienia do pożywki komórek bakteryjnych, **znamienny tym**, że jako pożywkę hodowlaną stosuje się, pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1 – 1:3.
2. Sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej polegający na przeniesieniu inokulum w ilości 5 – 20% objętościowych do wysterylizowanej pożywki produkcyjnej, prowadzeniu procesu produkcyjnego przy pH w zakresie 4,0 – 6,0, w temperaturze 25 – 30°C przez okres 3 – 20 dni, **znamienny tym**, że jako pożywkę produkcyjną stosuje się wysterylizowany, pozbawiony części stałych sok komórkowy z bulw ziemniaków, rozcieńczony wodą destylowaną w proporcji 3:1 – 1:3.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się inokulum opisane w zastrzeżeniu 1.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że do pożywki produkcyjnej przed przeprowadzeniem procesu fermentacji dodaje się alkohol etylowy w ilości 0,5 – 1,5 v/v%.
5. Sposób według zastrz. 2 lub zastrz. 4, **znamienny tym**, że hodowlę produkcyjną prowadzi się w warunkach stacjonarnych lub mieszania, przy szybkości obrotów 110 – 160 rpm.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się sok komórkowy z bulw ziemniaków o składzie 0,2 – 1,0 mg/mL białka oraz 8 – 40 mg/mL cukrów.