(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 246502 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441733**
(22) Data zgłoszenia: **2022.07.14**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.01.15 BUP 03/2024**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.03 WUP 05/2025**

(51) MKP:
A61L 27/24 *(2006.01)*
A61L 27/38 *(2006.01)*
C08H 1/06 *(2006.01)*

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MIROSŁAWA PROCHOŃ, Łódź, PL
SZYMON SZCZEPANIK, Łódź, PL
OLEKSANDRA DZEIKALA, Łódź, PL

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

(54) Tytuł:
Sposób wytwarzania biodegradowalnego bioplastiku o właściwościach funkcjonalnych, z surowca odpadowego przemysłu ubojowego w postaci skóry wieprzowej

PL 246502 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biodegradowalnego bioplastiku o właściwościach funkcjonalnych, z surowca odpadowego przemysłu ubojowego w postaci skóry wieprzowej, przeznaczonego na materiał biomimetyczny i biokompatybilny wykorzystywany w inżynierii tkankowej, cementach kostnych oraz do sekwestracji czynnika wzrostu.

Aktualnie, ze względu na wzrastającą świadomość ekologiczną środowiska naturalnego, poszukuje się tanich, wytrzymałych i biodegradowalnych materiałów proekologicznych, które zastąpiłyby produkty petrochemiczne. Coraz częściej spotyka się produkty z tworzyw sztucznych zawierające napełniacze powodujące ich przyśpieszony rozkład lub depolimeryzację. Niestety, nie jest to wystarczający krok ku polepszeniu stanowi środowiska naturalnego. Zaczęto więc sięgać po materiały naturalne, biopolimery, które ze względu na źródło pochodzenia (na przykład syntezy bakteryjne, ekstrakcje z tkanek zwierzęcych i roślinnych) ulegają degradacji do czynników nieszkodliwych dla środowiska. Polilaktyd (PLA), polihydroksymaślan (PHB), polisacharydy i inne biopolimery zostały uznane za materiały zdolne do poprawy biodegradowalności kompozytów je zawierających. Obiecujące właściwości mają polihydroksyalkaniany (PHA), ale niestety ich cena jest za wysoka, aby zastąpić nimi aktualnie stosowane, tanie tworzywa sztuczne. Jednakże są materiały nie tak kosztowne oraz o szerokim przetwórstwie, z których można wytworzyć produkt wytrzymały, którym będzie można zastąpić tworzywa sztuczne w danej dziedzinie przemysłu. Jednym z takich materiałów jest żelatyna, z której można uzyskać cienki, półprzezroczysty film, który jest elastyczny i wytrzymały mechanicznie.

Biopolimery produkuje się dotychczas dwoma metodami, suchą i mokrą.

Metoda mokra polega na zastosowaniu związków błonotwórczych rozpuszczonych lub zdyspergowanych w układach wodnych: czystej wodzie (na przykład żelatyna), wodno-kwasowych (na przykład chitozan), wodno-alkalicznych (na przykład kazeina) lub wodzie zmieszanej ze współrozpuszczalnikiem (na przykład etanolem w przypadku glutenu pszennego lub zeiny kukurydzianej). Mieszaninę reakcyjną odlewa się lub natryskuje na powierzchnię w celu wytworzenia filmu lub powłoki. Natomiast metoda sucha wytwarzania biopolimerów polega na prasowaniu w temperaturze pokojowej lub podwyższonej oraz wytłaczaniu. W metodzie suchej nie stosuje się rozpuszczalników, metoda ta zajmuje mało miejsca na przetwarzanie, można nią wytwarzać niewielkie ilości biopolimeru i jest szybsza niż metoda mokra, a ponadto można ją poddać skalowaniu, dzięki czemu produkt jest łatwy do implementacji na skalę przemysłową (czasopismo *Food Packaging and Shelf Life* 2021, 29, 100688).

W czasopiśmie *Trends in Biotechnology* 2020, 38, 5, 546–557 ujawniono sposób otrzymania matrycy żelatynowej do sekwestracji czynnika wzrostu wykorzystanego do inżynierii tkankowej. Żelatyna była jednym z najszerzej badanych nośników czynników wzrostu ze względu na jej naturalne właściwości fizykochemiczne, umożliwiające z kolei wysoką wydajność, a także modyfikowalność procesów sieciowania i wytwarzania, zapewniającą szeroki zakres mechanizmów sekwestracji czynników wzrostu. W przeciwieństwie do przeszczepu komórek, który obejmuje wszczepianie autologicznych lub egzogennych źródeł pluripotencjalnych komórek w celu zastąpienia uszkodzonych lub utraconych populacji komórek, dostarczanie czynnika wzrostu na bazie żelatyny, omija ryzyko rakotwórczości, koszty i przeszkody translacyjne ekspansji ex vivo, a także etyczne obawy.

Przeszczepy kostne są szeroko stosowane w medycynie, artroplastyce oraz przy leczeniu ubytków kostnych. Terapie białkowe stają się szeroko stosowane, ponieważ terapie przeszczepowe powodują ból dawcy i są w ograniczonej podaży, a przetworzone alloprzeszczepy wykazują ograniczoną bioaktywność lub ryzyko infekcji (*czasopismo Journal of Bone and Joint Surgery – Series A* 2007 89, 3, 649–658).

Oprócz tego, coraz więcej badań sugeruje, że sygnalizacja komórkowa za pośrednictwem integryn inicjowana przez macierz pozakomórkową, może wpływać na regenerację tkanek. Na przykład wykazano, że oddziaływanie integryny $\alpha_2\beta_1$ z białkiem naśladującym kolagen poprawia regenerację kości (czasopismo *Biomaterials* 2014 35, 21, 5453–5461).

W czasopiśmie *Journal of Materials Chemistry B* 2016, 4, 1070 opisano scaffold'y metakryloamidowo-żelatynowe naśladujące zarówno budowę fizyczną jak i skład chemiczny naturalnej macierzy pozakomórkowej kości. Taki materiał wytworzono za pomocą termicznie indukowanych technik separacji faz. Scaffold'y in vitro poprawiły adhezję, proliferację i różnicowanie osteogenne szczurzych komórek zrębowych pochodzących z tkanki tłuszczowej, a także mnożenie się komórek. Biomimetyczne scaffold'y metakryloamidowo-żelatynowe mogą promować tworzenie kości oraz zapewnić nową wizję badań nad inżynierią tkanki kostnej we wszechstronnym systemie hydrożelowym.

Oprócz zastosowania w materiałach wspomagających wzrost tkanki kostnej, żelatyna oddziałuje także z cementami kostnymi polepszając ich właściwości mechaniczne (czasopismo *The International Journal of Artificial Organs* 2004, 27, 8). Wstępne wyniki wskazują, że dodatek żelatyny do cementu wapniowo-fosforanowego powoduje poprawę zarówno mechanicznych jak i biologicznych właściwości biokompozytu. Żelatyna wspomagana cementem wapniowo-fosforanowym wykazuje lepszą wytrzymałość na ściskanie i twardość oraz zwiększoną aktywację osteoblastów i procesów mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej w porównaniu z niewspomaganym cementem. Żelatynowy cement wydaje się obiecującym materiałem biomimetycznym, który może być z powodzeniem stosowany jako substytut kości.

Znany jest enzymatyczny sposób inkubacji kolagenu skóry wieprzowej w wyniku działania na skórę wodnym roztworem enzymu proteolitycznego o stężeniu 0,44%–1,0% $\left[\frac{w}{v}\right]$ w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin, w którym stosuje się 0,0033 części wagowe enzymu proteolitycznego na 1 część wagową skóry wieprzowej.

Celem niniejszego wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania biodegradowalnego bioplastiku o właściwościach funkcjonalnych z surowca odpadowego przemysłu ubojowego w postaci skóry wieprzowej, znajdującego zastosowanie w inżynierii tkankowej, cementach kostnych oraz do sekwestracji czynnika wzrostu.

Sposób wytwarzania biodegradowalnego bioplastiku o właściwościach funkcjonalnych z surowca odpadowego przemysłu ubojowego w postaci skóry wieprzowej, z wykorzystaniem enzymatycznego sposobu inkubacji kolagenu skóry wieprzowej w wyniku działania na skórę wodnym roztworem enzymu proteolitycznego o stężeniu 0,44%–1,0% $\left[\frac{w}{v}\right]$ w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin, w którym stosuje się 0,0033 części wagowej enzymu proteolitycznego na 1 część wagową skóry wieprzowej, **według wynalazku** polega na tym, że do mieszaniny po enzymatycznej inkubacji kolagenu skóry wieprzowej stanowiącej odpad przemysłu ubojowego, dodaje się, w przeliczeniu na 1 część wagową skóry wieprzowej, 0,5M wodny roztwór kwasu octowego ilości 6 części wagowych, a następnie glicerynę bezwodną o gęstości 1,26 $\left[\frac{g}{ml}\right]$ / 20°C w ilości 0,2 części wagowej, wysuszoną kazeinę w ilości 0,1 części wagowej oraz wysuszoną żelatynę spożywczą o wskaźniku 180° jednostek Bloom'a, w ilości 0,1 części wagowej i całość miesza się w temperaturze 70–80°C w czasie 240 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną zatęża się w formie silikonowej lub teflonowej w temperaturze 80–90°C w czasie 24 godzin. Zatężoną mieszaninę reakcyjną pobraną z formy poddaje się prasowaniu w temperaturze 105°C, pod ciśnieniem 12 MPa, w czasie 7 minut, w wyniku czego otrzymuje się bioplastik w postaci folii.

Sposób według wynalazku umożliwia wykorzystanie produktu odpadowego przemysłu ubojowego do wytworzenia biodegradowalnego, biomimetycznego i biokompatybilnego materiału termoplastycznego charakteryzującego się pozytywnymi właściwościami mechanicznymi, stabilnością termiczną i rozbudowaną siecią polimerową, stanowiącego obiecujący materiał do zastąpienia i/lub ograniczenia użycia tworzyw sztucznych.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1

Przygotowano w częściach wagowych:

skóra wieprzowa	10 części
enzym proteolityczny NUE 12 MG	0,033 części
woda destylowana	7,5 części
wodny roztwór kwasu octowego 0,5 M	60 części
gliceryna bezwodna o gęstości 1,26 $\left[\frac{g}{ml}\right]$ / 20°C	2 części
wysuszona kazeina	1 część
wysuszona żelatyna spożywcza o wskaźniku 180° jednostek Bloom'a	1 część.

Najpierw pocięto skórę wieprzową stanowiącą odpad przemysłu ubojowego i 10 części wagowych pociętej skóry wprowadzono do reaktora chemicznego, po czym dodano 7,5 części wagowych wody destylowanej oraz 0,033 części wagowej enzymu proteolitycznego. Proces enzymatycznej inkubacji kolagenu skóry prowadzono przez 24 godziny. Po upływie tego czasu skórę wieprzową wraz z roztworem enzymu przeniesiono do reaktora wyposażonego w system kontroli temperatury oraz mieszania składników, po czym do reaktora dodano 60 części wagowych 0,5M roztworu kwasu octowego,

2 części wagowe gliceryny, 1 część wagową kazeiny oraz 1 część wagową żelatyny spożywczej. Całość podgrzano do temperatury 75°C i wolno mieszano przez 240 minut. Po upływie tego czasu roztwór z reaktora przeniesiono do formy teflonowej i zatężono w komorze o temperaturze 80°C przez okres 24 godzin. Mieszaninę reakcyjną po zatężeniu pobrano z formy i poddano prasowaniu w temperaturze 105°C, pod ciśnieniem 12 MPa, w czasie 7 minut.

Otrzymano produkt końcowy w postaci folii.

Przykład 2

Przygotowano w częściach wagowych:

skóra wieprzowa	25 części
enzym proteolityczny NUE 12 MG	0,083 części
woda destylowana	18,8 części
wodny roztwór kwasu octowego 0,5 M	150 części
gliceryna bezwodna o gęstości 1,26 $\left[\frac{g}{ml}\right]$ / 20°C	5 części
wysuszona kazeina	2,5 części
wysuszona żelatyna spożywcza o wskaźniku 180° jednostek Bloom'a	2,5 części.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano produkt końcowy w postaci folii.

Przykład 3

Przygotowano w częściach wagowych

skóra wieprzowa	40 części
enzym proteolityczny NUE 12 MG	0,132 części
woda destylowana	30 części
wodny roztwór kwasu octowego 0,5 M	240 części
gliceryna bezwodna o gęstości 1,26 $\left[\frac{g}{ml}\right]$ / 20°C	8 części
wysuszona kazeina	4 części
wysuszona żelatyna spożywcza o wskaźniku 180° jednostek Bloom'a	4 części.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano produkt końcowy w postaci folii.

Produkty końcowe otrzymane w przykładach wykazywały korzystne właściwości mechaniczne dzięki łańcuchowi głównemu żelatyny przedłużonemu przez grupę $-C_3H_6$ widoczną w badaniu spektroskopii w podczerwieni (FTIR), zapewniając tym samym lepszą sieć w biopolimerze. Twardość produktów (*H*, °*Sh*) była na poziomie 91.10–93.59. Badanie statycznych właściwości mechanicznych produktów końcowych otrzymanych w przykładach wykazało, że charakteryzowały się one wytrzymałością na rozciąganie (T_{Sb}) na poziomie 2.60–3.62 MPa oraz danym wydłużeniem przy zerwaniu (E_{Sb}) na poziomie 6.00–10.60%. Przeprowadzono również analizy termiczne DSC/TGA produktów otrzymanych w przykładach, które wykazały temperaturę ich zeszklenia 40.50–40.60°C oraz pojemność cieplną 0.10–0.415 $\left[\frac{J}{K}\right]$. Analiza Swobodnej Energii Powierzchniowej (SEP) wykazała kąt zwilżania wody dla tych produktów na poziomie 39–47° oraz energię powierzchniową 42–44 $\left[\frac{mJ}{m^2}\right]$.

Produkty otrzymane w przykładach ulegały biodegradacji i kompostowaniu ze względu na obecność charakterystycznych ugrupowań polarnych (-OH, =O etc.) w widmie 3270 cm^{-1}, na co wskazały badania spektroskopowe przeprowadzone w podczerwieni metodą Fouriera (FTiR). Oprócz tego, widoczne były także pasma pochłaniania w zakresie 1680 cm^{-1} wskazujące z kolei na sygnał od polarnych ugrupowań COO-. Piki pochodzące od wiązań aromatycznych kazeiny można było przypisać pasmu przy liczbie falowej 920 cm^{-1}. Zaobserwowano także białka pierwszo- i drugorzędowe (1240–1530 cm^{-1}). Produkty charakteryzowały się obecnością pasm w zakresie liczby falowej 800–950 cm^{-1}. Zakres ten odpowiadał łańcuchom $-C_3H_6$, stanowiącym przedłużenie szkieletu głównego lub łańcuchów bocznych w sieci polimerowej, co potwierdziły także wyniki analiz mechanicznych. Dodatkowo produkty końcowe wykazywały w widmie spektroskopowym obecność piku odpowiadającego wiązaniom -HCO- (943 cm^{-1}). Tego typu oddziaływania podczas syntezy, mogły powstać w wyniku zerwania bocznych ugrupowań łańcucha polimerowego.

Ze zdjęć wykonanych elektronowym mikroskopem skaningowym SEM wynikało, że sieć wytworzona w produktach otrzymanych w przykładach wykazuje stabilność przestrzenną oraz nie posiada defektów na powierzchni lub porów. Zastosowanie naturalnych składników (żelatyna, kazeina) oraz zastosowanie enzymu proteolitycznego zapewniło w krótkim czasie całkowitą biodegradowalność i kompostowalność materiałów otrzymanych w przykładach, stwierdzoną na podstawie testów biologicznych wykonanych zgodnie z normą PN-EN ISO 846 w komorze klimatycznej. Efektem przyśpieszonego rozkładu ww. materiałów była obecność struktur wodorotlenowych pochodzących od dodatku kazeiny oraz żelatyny pozyskanej bezpośrednio z kolagenu skóry wieprzowej.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania biodegradowalnego bioplastiku o właściwościach funkcjonalnych, z surowca odpadowego przemysłu ubojowego w postaci skóry wieprzowej, z wykorzystaniem enzymatycznego sposobu inkubacji kolagenu skóry wieprzowej w wyniku działania na skórę wodnym roztworem enzymu proteolitycznego o stężeniu 0,44%–1,0% $\left[\frac{w}{v}\right]$ w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin, w którym stosuje się 0,0033 części wagowej enzymu proteolitycznego na 1 część wagową skóry wieprzowej, **znamienny tym**, że do mieszaniny po enzymatycznej inkubacji kolagenu skóry wieprzowej stanowiącej odpad przemysłu ubojowego, dodaje się, w przeliczeniu na 1 część wagową skóry wieprzowej, 0,5M wodny roztwór kwasu octowego w ilości 6 części wagowych, a następnie glicerynę bezwodną o gęstości 1,26 $\left[\frac{g}{ml}\right]$ / 20°C w ilości 0,2 części wagowej, wysuszoną kazeinę w ilości 0,1 części wagowej oraz wysuszoną żelatynę spożywczą o wskaźniku 180° jednostek Bloom'a, w ilości 0,1 części wagowej i całość miesza się w temperaturze 70–80°C w czasie 240 minut, następnie mieszaninę reakcyjną zatęża się w formie silikonowej lub teflonowej w temperaturze 80–90°C w czasie 24 godzin, po czym zatężoną mieszaninę reakcyjną pobraną z formy poddaje się prasowaniu w temperaturze 105°C, pod ciśnieniem 12 MPa, w czasie 7 minut, w wyniku czego otrzymuje się bioplastik w postaci folii.