

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244266 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443103**

(22) Data zgłoszenia: **2022.12.09**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.05.15 BUP 20/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.27 WUP 52/2023**

(51) MKP:

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

C08J 5/18 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu, Toruń, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**DOROTA CHEŁMINIAK-DUDKIEWICZ, Toruń, PL
MARTA ZIEGLER-BOROWSKA, Toruń, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Magdalena Filipek-Marzec,
Katowice, PL**

(54) Tytuł:

Folia kefiranowa oraz sposób jej wytwarzania

PL 244266 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest folia kefiranowa oraz sposób wytwarzania folii kefiranowej.

Kefiran jest egzopolisacharydem, otrzymywanym z mikroorganizmów obecnych w ziarnach kefiru. Wytwarzany jest przez kilka gatunków *Lactobacillus*, takich jak: *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Ze względu na dobre właściwości mechaniczne i barierowe kefiranu, znajduje on zastosowanie w produkcji folii opakowaniowych, a także może być stosowany jako dodatek do żywności. Co więcej, unikalne cechy kefiranu, takie jak właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwutleniające i biobójcze, czynią go ponadto dobrym kandydatem na matrycę opatrunkową.

Znane są z publikacji „Synthesis and characterization of biocompatible methacrylated kefiran hydrogels: Towards tissue engineering applications” Radhouani et al, 2021, gdzie wskazano, że możliwości aplikacji hydrożeli są nadal ograniczone, głównie ze względu na ich niską wytrzymałość mechaniczną i kruchy charakter. Dlatego przeprowadza się kilka fizycznych i chemicznych modyfikacji sieciowania stosowane w celu poprawy ich właściwości. W tych badaniach metakrylowany kefiran został zsyntetyzowany w reakcji Kefiran z bezwodnikiem metakrylowym (MA). Opracowany MA-Kefiran scharakteryzowano fizykochemicznie, i jego właściwości biologiczne oceniane różnymi technikami. Modyfikację chemiczną MA-Kefiran potwierdzono za pomocą ¹H-NMR i FTIR, a GPC-SEC wykazało średnią Mw 793 kDa (PDI 1.3). Uzyskane dane mechaniczne wykazały, że MA-Kefiran jest płynem pseudoplastycznym z wytłoczeniem siła 11,21 2,87 N. Ponadto pomyślnie opracowano kriożele MA-Kefiran 3D i w pełni scharakteryzowane. Dzięki mikro-CT i SEM rusztowania wykazały wysoką porowatość ($85,53 \pm 0,15\%$) i wielkość porów ($33,67 \pm 3,13$ m), grube ściany porów ($11,92 \pm 0,44$ m) i jednorodną strukturę. MA-Kefiran okazał się biokompatybilny, ponieważ nie wykazuje aktywności hemolitycznej i jest wyższa funkcja komórkowa komórek L929 obserwowana w teście AlamarBlue®. Poprzez włączenie grup metakrylanowych w łańcuchu polisacharydowym kefiranu, opracowano produkt MA-Kefiran w postaci hydrożelu mającego zastosowanie w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej.

Każda rana, od momentu powstania, narażona jest na zakażenie drobnoustrojami, dlatego też do matrycy kefiranowej dodano przeciwbakteryjną wiołaceinę, będącą naturalnym barwnikiem produkowanym przez bakterię *Chromobacterium violaceum*, nadającym jej charakterystyczne fioletowo-purpurowe zabarwienie. Znane jest wykorzystanie wiołaceiny jako środka owadobójczego (opis patentowy EP 2632272) oraz chroniącego przed infestacją szkodników (opis patentowy EP 2770836). Nie ujawniono jednak ich zastosowania w materiałach opatrunkowych.

Celem wynalazku jest opracowanie takiego sposobu otrzymywania materiałów kefiranowych, które pozwolą na zastosowanie ich jako materiały opatrunkowe i biomateriały, a zatem zastosowanie kefiranu jako podłoża i matrycy polimerowej w materiałach opatrunkowych i biomateriałach, a także zastosowanie wiołaceiny jako substancji aktywnej w materiałach opatrunkowych i biomateriałach.

Zaletą wynalazku jest wykorzystanie wyłącznie naturalnych produktów do produkcji opatrunku, czyniąc go materiałem bezpiecznym i ekologicznym. Wykorzystane zostały naturalne substancje aktywne, zapewniające szereg właściwości, wspomagających gojenie ran (w tym: przeciwbakteryjne, przeciwbólowe, przeciwzapalne, regeneracyjne), nie powodując przy tym skutków ubocznych, co często ma miejsce w przypadku stosowania antybiotyków syntetycznych. Ważną cechą jest również łatwość uzyskania materiału oraz stosunkowo niskie koszty produkcji.

Istotą wynalazku jest folia kefiranowa charakteryzująca się tym, że zawiera kefiran w ilości od 30 do 40%, wiołaceinę w ilości od 3 do 4%, glicerynę w ilości od 1 do 4%, resztę stanowi woda dejonizowana.

Istotą wynalazku jest także sposób wytwarzania folii kefiranowej charakteryzujący się tym, że kefiran rozpuszcza się w wodzie dejonizowanej o temperaturze od 90 do 100°C w ilości od 0,1 g do 10 g korzystnie 0,2 g kefiranu na 10 mL wody dejonizowanej, miesza mieszadłem korzystnie magnetycznym, studzi, dodaje wiołaceinę w ilości od 0,05 mg do 0,2 mg korzystnie 0,1 mg wiołaceiny na 1 mL mieszaniny, miesza mieszadłem korzystnie magnetycznym, odgazowuje w suszarce próżniowej, dodaje glicerynę roślinną w ilości od 0,01 g do 0,05 g korzystnie 0,03 g gliceryny na 1 mL mieszaniny, miesza, i tak otrzymaną jednorodną mieszaninę wylewa na szalkę Petriego i zostawia aż do uformowania folii. Korzystnie kefiran jest kefiranem świeżo wyizolowanym. Korzystnie kefiran wyizolowano z grzybka tybetańskiego, korzystnie sposobem Rodriguesa. Korzystnie kefiran z wodą dejonizowaną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 400 do 800 rpm do najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 90°C do 100°C korzystnie 100°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 1 h.

Korzystnie studzenie prowadzi się aż do osiągnięcia temperatury od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C. Korzystnie mieszaninę z wiolaceiną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 300 do 800 rpm najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 30 min. Korzystnie odgazowanie prowadzi się w suszarce próżniowej w temperaturze od 40 do 60°C korzystnie 40°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 1 h. Korzystnie mieszaninę z gliceryną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 300 do 800 rpm najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 30 min. Korzystnie stosuje się szalkę Petriego z tworzywa sztucznego lub szklaną, korzystnie o średnicy od 30 do 60 mm najkorzystniej 45 mm. Korzystnie formowanie folii prowadzi się w suchym miejscu bez dostępu światła, korzystnie w czasie od 24 do 64 h najkorzystniej przez 48 h.

Przedmiot wynalazku został ukazany w poniższych przykładach wykonania.

Przykład I

W przykładzie wykonania wykorzystano kefiran, który samodzielnie wyizolowano z grzybka tybetańskiego, zgodnie z procedurą opisaną przez Rodrigues i współautorów (Kamila Leite Rodrigues, Luc'elia Rita Gaudino Caputo, Jose Carlos Tavares Carvalho, João Evangelista, Jose Maurício Schneider. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. International Journal of Antimicrobial Agents 25 (2005) 404–408.). Poza kefiranem, zastosowano również wiolaceinę.

W celu przygotowania folii kefiranowej z dodatkiem wiolaceiny, świeżo wyizolowany kefiran rozpuszczono w gorącej wodzie dejonizowanej (C=2% w/w) o temperaturze 90° w ilości 0,2 g na 10 mL wody mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego z prędkością 600 rpm w temperaturze 100°C przez 1 h.

Następnie, roztwór ostudzono do temperatury pokojowej 22°C, po czym dodano wiolaceiny (C=1%, 1 mL) w ilości 0,1 mg na 1 mL roztworu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej 22°C przez 30 min za pomocą mieszadła magnetycznego 600 rpm. Roztwór odgazowano w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C przez 1 h. Następnie dodano glicerynę roślinną w ilości 0,03 g na 1 mL roztworu jako pełniącą funkcję plastyfikatora, i kontynuowano mieszanie przez 30 min z prędkością 600 rpm w temperaturze pokojowej 22°C. Tak otrzymaną jednorodną mieszaninę wylano na plastikową szalkę Petriego o średnicy 45 mm i pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika aż do uformowania folii w suchym i zaciemnionym miejscu na 48 h.

W wyniku przykładu otrzymano folię kefiranową o dobrych właściwościach fizykochemicznych oraz przeciwbakteryjnych o następującym składzie:

- kefiran w ilości 35%
- wiolaceina w ilości 3,5%
- gliceryna roślinna w ilości 2,5%
- resztę stanowi woda dejonizowana

Analiza ATR-IR:

Pasmo przy 2921 cm⁻¹ wskazują na obecność drgań C-H w łańcuchu cukrowym kefiranu, co można przypisać grupom metylowym i metylenowym. Pasma przy 1408 cm⁻¹ związane jest z obecnością grup CH₂ i OH. Pasma w obszarze 1000–1200 cm⁻¹ wskazują na obecność wiązań C-O-C i C-O, pochodzących od grup alkoholowych kefiranu. W widmie pojawiają się także pasma, potwierdzające obecność wiolaceiny w otrzymanym filmie. Szerokie pasmo przy 3341 cm⁻¹ związane jest z obecnością grup NH rdzenia indolowego, natomiast pasmo przy 1651 cm⁻¹ odpowiada grupie karbonylowej obecnej w cząsteczce wiolaceiny.

W innych przykładach wykonania można wykorzystać kefiran wyizolowany z irańskich lub włoskich ziaren kefiru.

Przykład II

W przykładzie wykonania wykorzystano kefiran, który samodzielnie wyizolowano z grzybka tybetańskiego, zgodnie z procedurą opisaną przez Rodrigues i współautorów (Kamila Leite Rodrigues, Luc'elia Rita Gaudino Caputo, Jose Carlos Tavares Carvalho, João Evangelista, Jose Maurício Schneider. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. International Journal of Antimicrobial Agents 25 (2005) 404–408.). Poza kefiranem, zastosowano również wiolaceinę.

W celu przygotowania folii kefiranowej z dodatkiem wiolaceiny, świeżo wyizolowany kefiran rozpuszczono w gorącej wodzie dejonizowanej (C=2% w/w) o temperaturze 95° w ilości 5 g na 10 mL wody mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego z prędkością 400 rpm w temperaturze 95°C przez 0,02 h.

Następnie, roztwór ostudzono do temperatury pokojowej 18°C, po czym dodano wiołaceiny (C=1%, 1 mL) w ilości 0,05 mg na 1 mL roztworu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej 18°C przez 0,2 h za pomocą mieszadła magnetycznego 400 rpm w temperaturze pokojowej. Roztwór odgazowano w suszarce próżniowej w temperaturze 50°C przez 0,2 h. Następnie dodano glicerynę roślinną w ilości 0,01 g na 1 mL roztworu jako pełniącą funkcję plastyfikatora, i kontynuowano mieszanie przez 0,2 h z prędkością 300 rpm w temperaturze pokojowej 18°C. Tak otrzymaną jednorodną mieszaninę wylano na plastikową szalkę Petriego o średnicy 30 mm i pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika aż do uformowania folii w suchym i zaciemnionym miejscu na 64 h.

W wyniku przykładu otrzymano folię kefiranową o dobrych właściwościach fizykochemicznych oraz przeciwbakteryjnych o następującym składzie:

- kefiran w ilości 30%
- wiołaceina w ilości 3%
- gliceryna roślinna w ilości 1%
- resztę stanowi woda dejonizowana

W innych przykładach wykonania można wykorzystać kefiran wyizolowany z irańskich lub włoskich ziaren kefiranu.

Przykład III

W przykładzie wykonania wykorzystano kefiran, który samodzielnie wyizolowano z grzybka tybetańskiego, zgodnie z procedurą opisaną przez Rodrigues i współautorów (Kamila Leite Rodrigues, Luc'elia Rita Gaudino Caputo, Jose Carlos Tavares Carvalho, João Evangelista, Jose Mau'ico Schnedorf. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. International Journal of Antimicrobial Agents 25 (2005) 404–408.). Poza kefiranem, zastosowano również wiołaceinę, zakupioną z firmy Im-muno-Life.

W celu przygotowania folii kefiranowej z dodatkiem wiołaceiny, świeżo wyizolowany kefiran rozpuszczono w gorącej wodzie dejonizowanej (C=2% w/w) o temperaturze 100° w ilości 10 g na 10 mL wody mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego z prędkością 800 rpm w temperaturze 90°C przez 1,5 h.

Następnie, roztwór ostudzono do temperatury pokojowej 25°C, po czym dodano wiołaceiny (C=1%, 1 mL) w ilości 0,2 mg na 1 mL roztworu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej 25°C przez 1,5 h za pomocą mieszadła magnetycznego 800 rpm w temperaturze pokojowej. Roztwór odgazowano w suszarce próżniowej w temperaturze 60°C przez 1,5 h. Następnie dodano glicerynę roślinną w ilości 0,05 g na 1 mL roztworu jako pełniącą funkcję plastyfikatora, i kontynuowano mieszanie przez 1,5 h z prędkością 800 rpm w temperaturze pokojowej 25°C. Tak otrzymaną jednorodną mieszaninę wylano na plastikową szalkę Petriego o średnicy 60 mm i pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika aż do uformowania folii w suchym i zaciemnionym miejscu na 24 h.

W wyniku przykładu otrzymano folię kefiranową o dobrych właściwościach fizykochemicznych oraz przeciwbakteryjnych o następującym składzie:

- kefiran w ilości 40%
- wiołaceina w ilości 4%
- gliceryna roślinna w ilości 4%
- resztę stanowi woda dejonizowana

W innych przykładach wykonania można wykorzystać kefiran wyizolowany z irańskich lub włoskich ziaren kefiru.

Zastrzeżenia patentowe

1. Folia kefiranowa **znamienna tym**, że zawiera kefiran w ilości od 30 do 40%, wiołaceinę w ilości od 3 do 4%, glicerynę w ilości od 1 do 4%, resztę stanowi woda dejonizowana.
2. Sposób wytwarzania folii kefiranowej **znamienny tym**, że kefiran rozpuszcza się w wodzie dejonizowanej o temperaturze od 90 do 100°C w ilości od 0,1 g do 10 g korzystnie 0,2 g kefiranu na 10 mL wody dejonizowanej, miesza mieszadłem korzystnie magnetycznym, studzi, dodaje wiołaceinę w ilości od 0,05 mg do 0,2 mg korzystnie 0,1 mg wiołaceiny na 1 mL mieszaniny, miesza mieszadłem korzystnie magnetycznym, odgazowuje w suszarce próżniowej, dodaje glicerynę roślinną w ilości od 0,01 g do 0,05 g korzystnie 0,03 g gliceryny na 1 mL

- mieszaniny, miesza, i tak otrzymaną jednorodną mieszaninę wylewa na szalkę Petriego i zostawia aż do uformowania folii.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że kefiran jest kefiranem świeżo wyizolowanym.
 4. Sposób według zastrz. 2 lub 3 **znamienny tym**, że kefiran wyizolowano z grzybka tybetańskiego, korzystnie sposobem Rodriguesa.
 5. Sposób według zastrz. 2, 3 lub 4 **znamienny tym**, że kefiran z wodą dejonizowaną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 400 do 800 rpm do najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 90°C do 100°C korzystnie 100°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 1 h.
 6. Sposób według zastrz. 2, 3, 4 lub 5 **znamienny tym**, że studzenie prowadzi się aż do osiągnięcia temperatury od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C.
 7. Sposób według zastrz. 2, 3, 4, 5 lub 6 **znamienny tym**, że mieszaninę z wiołaceiną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 300 do 800 rpm najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 30 min.
 8. Sposób według zastrz. 2, 3, 4, 5, 6 lub 7 **znamienny tym**, że odgazowanie prowadzi się w suszarce próżniowej w temperaturze od 40 do 60°C korzystnie 40°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 1h.
 9. Sposób według zastrz. 2, 3, 4, 5, 6, 7 lub 8 **znamienny tym**, że mieszaninę z gliceryną miesza się mieszadłem korzystnie magnetycznym korzystnie z prędkością od 300 do 800 rpm najkorzystniej 600 rpm, w temperaturze od 18°C do 25°C mieszaniny, korzystnie 22°C w czasie od 0,2 do 1,5 h korzystnie 30 min.
 10. Sposób według zastrz. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 lub 9 **znamienny tym**, że stosuje się szalkę Petriego z tworzywa sztucznego lub szklaną, korzystnie o średnicy od 30 do 60 mm najkorzystniej 45 mm.
 11. Sposób według zastrz. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 lub 10 **znamienny tym**, że formowanie folii prowadzi się w suchym miejscu bez dostępu światła, korzystnie w czasie od 24 do 64 h najkorzystniej przez 48 h.