

**Modelowanie *in situ* biosyntezy i właściwości fizyko-mechanicznych
nanocelulozy bakteryjnej**

mgr inż. Izabela Cielecka

Promotor

Prof. dr hab. inż. Stanisław Bielecki

Streszczenie

Celuloza jest najbardziej rozpowszechnionym biopolimerem w przyrodzie, a jej bogatym źródłem są przede wszystkim tkanki roślinne, gdzie występuje ona w kompleksie z ligninami, hemicelulozą i innymi składnikami. Proces jej oczyszczania jest związany z zastosowaniem związków chemicznych, nieprzyjaznych środowisku. Alternatywą jest bakteryjna nanoceluloza (BNC), wytwarzana przez mikroorganizmy w chemicznie czystej formie. Zdolność do jej biosyntezy ma wiele bakterii, a najwydajniejszym producentem są bakterie z rodzaju *Komagataeibacter*. BNC charakteryzuje się taką samą strukturą chemiczną, jak celuloza pochodzenia roślinnego, nie mniej wykazuje inne właściwości. Włókna bakteryjnej nanocelulozy osiągają szerokość w zakresie 25 do 100 nm i tworzą trójwymiarową sieć poprzez liczne międzycząsteczkowe i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe oraz oddziaływania van der Waalsa. Celuloza bakteryjna jest materiałem o wysokiej krystaliczności, porowatości, dużej wytrzymałości mechanicznej i elastyczności oraz wysokiej zdolności do utrzymywania wody. Ponadto, jest ona biokompatybilna, a przestrzenna i silnie uwodniona struktura z powodzeniem imituje naturalną zewnątrzkomórkową macierz. Te właściwości stanowią o szerokim potencjale aplikacyjnym BNC nie tylko w obszarze medycznym, ale również w przemyśle spożywczym, elektronice i ochronie środowiska.

Pomimo szeregu zalet celulozy bakteryjnej, jej komercjalizacja jest utrudniona, głównie ze względu na wysoki koszt i niską wydajność procesu wytwarzania. Wydajność produkcji celulozy, a także jej końcowe właściwości są silnie uzależnione od warunków hodowli, takich jak skład podłoża hodowlanego, rodzaj hodowli, warunki środowiskowe, a także modyfikacje *in situ*. Dodatki do podłoża, które zwiększają wydajność biosyntezy lub modulują właściwości BNC, można podzielić na dwie grupy: związki wpływające na metabolizm bakterii oraz substancje inkorporujące w trójwymiarową strukturę celulozy. Również bardzo istotnym czynnikiem dla jakości BNC jest dobór szczepu produkcyjnego i jego ewentualne modyfikacje genetyczne. Zatem, sterując parametrami hodowli bakterii z rodzaju *Komagataeibacter* można modulować wytrzymałość mechaniczną, porowatość, zdolności absorpcyjne i inne właściwości fizyko-chemiczne celulozy bakteryjnej.

Doskonalenie wydajności procesu i właściwości celulozy bakteryjnej jest zagadnieniem istotnym z punktu widzenia jej aplikacyjności i późniejszej komercjalizacji. Biodegradowalność, łatwość jej pozyskiwania, określone procedury modyfikacji pod zastosowania oraz niska emisja zanieczyszczeń przy produkcji będą kluczowe podczas decyzji o zastąpieniu celulozą bakteryjną syntetycznych materiałów w wielu gałęziach przemysłu.

Celem pracy było określenie wpływu wybranych modyfikacji *in situ* hodowli bakterii z rodzaju *Komagataeibacter* na wydajność i właściwości celulozy bakteryjnej, takie jak wytrzymałość mechaniczna, stopień krystaliczności, grubość i ułożenie włókien oraz zdolność do utrzymywania i retencji wody.

W pierwszym etapie badań zbadano wpływ modyfikacji podłoża hodowlanego z zastosowaniem κ -karagenu w formie usieciowionej w stężeniu 0,2%-0,8% oraz w formie uwodnionych agregatów w stężeniu 2% do 4%. W pierwszym wariancie uzyskano błony o rozluźnionej strukturze i grubszych włóknach, natomiast w drugim wariancie otrzymano membrany o wysokiej porowatości i cieńszych włóknach. Wszystkie kompozyty celulozy z κ -karagenem charakteryzowały się zmniejszoną zdolnością do utrzymywania wody i pęcznienia, a także obniżonym stopniem krystaliczności. Z drugiej strony poprawie uległ czas retencji wody oraz wytrzymałość na rozciąganie i ściskanie. W hodowli mysich chondrocytów ATDC5 na uzyskanych kompozytach poddano ocenie wpływ modyfikacji *in situ* celulozy bakteryjnej κ -karagenem na przeżywalność oraz prawidłowe różnicowanie komórek.

W drugim etapie pracy oceniono wpływ modyfikacji *in situ* podłoża z wykorzystaniem karboksymetylocelulozy (CMC) i hydroksyetolocelulozy (HEC) na wydajność biosyntezy, strukturę błon celulozowych i grubość włókien, oraz krystaliczność. Modyfikacja podłoża przy użyciu HEC nie wpływała na wydajność biosyntezy, natomiast powodowała niewielkie obniżenie produkcji celulozy przy zastosowaniu CMC. Zmianie uległa struktura kompozytów, która była luźniejsza w przypadku CMC, lub składała się z cieńszych włókien w obecności HEC. W obu wariantach krystaliczność celulozy była niższa od krystaliczności natywnej celulozy. Kompozyty oraz natywną nanocelulozę bakteryjną zmodyfikowano następnie glicerolem z zakresie stężeń 0,1% do 10%. Okazało się, że nasączenie błon 2,5% roztworem glicerolu pozwala uzyskać membrany o najwyższej chłonności w stosunku do płynu imitującego wysięk. Z kolei wtórna retencja wody była najwyższa dla błon modyfikowanych 10% glicerolem. We wszystkich wariantach stężenia plastyfikatora, kompozyty BNC wykazywały wyższą chłonność płynu imitującego wysięk i odzysk wody, niż natywna celuloza, przy czym najwyższe wartości uzyskano w przypadku kompozytów z CMC. Podobny trend obserwowano w przypadku wytrzymałości mechanicznej modyfikowanych membran. Bezpieczeństwo kompozytów oceniono z zastosowaniem linii komórkowej ludzkich keratynocytów HaCeT. Obserwowano ochronny wpływ celulozy i jej kompozytów na badane komórki w obecności różnych stężeń glicerolu. Ponadto, dla wszystkich wariantów BNC i kompozytów impregnowanych 2,5% glicerolem przeżywalność komórek HaCeT utrzymywała się na stałym poziomie lub ulegała zwiększeniu w stosunku do kontroli.

Kolejny etap badań dotyczył wpływu warunków hodowli na wydajność procesu i parametry wytrzymałościowe celulozy bakteryjnej. W ramach realizacji pracy zaprojektowano bioreaktor SAF (z ang. surface air-flow bioreactor) z możliwością wymuszenia obiegu powietrza równoległe do narastającej błony celulozowej. Z zastosowaniem planu eliminacyjnego Placketta-Burmana, dokonano oceny istotności wpływu rozmiarów bioreaktora, czasu hodowli, wieku i ilości inokulum, stosunku s/v, stężenia glukozy, pH, prędkości przepływu powietrza oraz jego wilgotności na uzysk suchej masy, konwersję glukozy do celulozy oraz gramaturę błon celulozowych. Uzyskane wyniki pokazały, że większość badanych czynników wejściowych wpływa w sposób istotny na wydajność BNC. Dalsze badania wykazały, że wśród wielu czynników, mających pozytywny wpływ na jednocześnie

wydajność i wytrzymałość mechaniczną największe znaczenie ma stężenie glukozy, czas hodowli oraz szybkość przepływu powietrza.

W ramach następnego etapu prac określono, jak dotąd nieopisany w literaturze światowej, wpływ jednoczesnej modyfikacji podłoża etanolem i kwasem mlekowym na wydajność i właściwości celulozy bakteryjnej. Najbardziej korzystne stężenia przy zastosowaniu pojedynczego związku wyznaczono na poziomie 1% w przypadku alkoholu etylowego i 0,6% dla kwasu mlekowego. Optymalizacja procesu pod kątem współdziałania badanych związków pozwoliła na wytypowanie podłoża optymalnego o pH 6,25, zawierającego 0,73% kwasu mlekowego i 0,34% etanolu. Wydajność biosyntezy BNC w tym medium uległa kilkukrotnemu zwiększeniu (4,36 g/l), w stosunku do wydajności na niemodyfikowanym podłożu SH (0,77 g/l). W pracy dokonano analizy zmian zachodzących w podłożach suplementowanych jednym lub oboma związkami modyfikującymi. Jednoczesne wzbogacanie podłoża etanolem i kwasem mlekowym pozwalało na biosyntezę błon o wysokiej porowatości i znacząco zwiększonej zdolności do utrzymywania wody. Niezależnie od rodzaju modyfikacji, stopień krystaliczności i średnia wielkość krystalitu celulozy były obniżone dla wszystkich wariantów. Parametry wytrzymałościowe, takie jak naprężenie, moduł Younga, siła niezbędna do zerwania oraz wiązkość, uległy znaczącej poprawie.

W ostatnim etapie pracy dokonano izolacji nowego szczepu bakterii produkującego celulozę. Został on zidentyfikowany jako *Komagataeibacter hansenii* i nazwany SI1. Celuloza produkowana przez ten szczep wykazuje wysoką porowatość oraz podatność na rozciąganie. Wykazano, że *K. hansenii* SI1 charakteryzuje się szybkim wzrostem i syntetyzuje celulozę do 4 dnia hodowli. Spośród przebadanych źródeł węgla najwyższą wydajność biosyntezy uzyskano z zastosowaniem glicerolu. Należy zaznaczyć, że membrana zachowywała zdolność do plastycznego odkształcenia jedynie w przypadku produkcji w medium zawierającym glukozę. W badaniach wykazano również, że do maksymalnej wydajności procesu niezbędne jest kompleksowe, organiczne źródło azotu. Wpływ pH na biosyntezę BNC i właściwości mechaniczne błon był natomiast zależny od zastosowanego źródła węgla. Wpływ modyfikacji podłoża z zastosowaniem etanolu, kwasu mlekowego oraz witaminy C był znikomy lub negatywny w stosunku do wydajności procesu, natomiast obserwowano istotne zmiany w strukturze i wytrzymałości mechanicznej. W szczególności, witamina C uwydatniała unikatowe cechy BNC produkowanej przez *K. hansenii* SI1. Obserwowano wzrost porowatości celulozy oraz jej podatności na rozciąganie, wraz ze wzrostem stężenia witaminy C w medium. Ponadto, błony te charakteryzowały się wyższą krystalicznością od niemodyfikowanej BNC.

Wyniki badań w przedstawionej pracy potwierdzają korzystny wpływ modyfikacji *in situ* celulozy bakteryjnej z zastosowaniem związków wielko- i niskocząsteczkowych na wydajność biosyntezy i/lub jej właściwości fizyczne i mechaniczne. Ponadto, wykazano, że odpowiedni dobór parametrów procesowych pozwoli nie tylko na zwiększenie efektywności procesu, ale również jakości produkowanych błon celulozowych. Opracowany w ramach badań bioreaktor SAF pozwala na jednoczesne zwiększenie produktywności i wydajności

procesu oraz parametrów wytrzymałościowych BNC. Z kolei sposób otrzymywania unikalnych błon o zwiększonej porowatości i rozciągliwości z zastosowaniem nowo wyizolowanego szczepu *K. hansenii* SI1 został opatentowany (Pat.241158).