

ALINA KRYSZTYNOWICZ, WOJCIECH CZAJA, STANISŁAW BIELECKI

BIOSYNTETA I MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA CELULOZY BAKTERYJNEJ

Streszczenie

Produkcja celulozy bakteryjnej na skalę przemysłową jest jak dotychczas niewielka, głównie ze względu na trudności związane z wyselekcjonowaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wglębnej, a także ze względu na wysokie koszty składników podłoża.

Dotychczasowe badania nad biosyntezą celulozy przez *Acetobacter xylinum* wykazały, że polimer ten jest wydzielany na zewnątrz komórek w postaci wstążek tworzących misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli stacjonarnej formuje na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą błonę. Dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, celuloza bakteryjna znalazła zastosowanie, szczególnie w przemyśle papierniczym, włókienniczym, spożywczym oraz w medycynie.

Wstęp

Wytwarzanie polimerów metodami mikrobiologicznymi oraz ich aplikacja stanowi jeden z głównych kierunków badań w dziedzinie biotechnologii. Spośród drobno-ustrojów zdolnych do nadprodukcji celulozy znaczenie przemysłowe mają wyselekcjonowane szczepy *Acetobacter xylinum* [17, 25]. Bakterie te stały się modelem badawczym, który umożliwił wyjaśnienie drogi biosyntezy celulozy i jej regulacji, poznanie struktury polimeru oraz jego funkcji komórkowej [25, 14].

Badania nad biosyntezą celulozy przez *Acetobacter xylinum* wykazały, że polimer ten jest wydzielany na zewnątrz komórek w postaci wstążek tworzących misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli stacjonarnej formuje na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą błonę o grubości dochodzącej nawet do 8 cm [18]. Z błony takiej, po oczyszczeniu i wysuszeniu, otrzymuje się produkt przypominający cienki pergaminowy papier o grubości 0,01–0,5 mm, będący prawie czystą (w około 97%), wysokokrystaliczną α -celulozą, o stopniu polimeryzacji 2000–6000 [18, 29].

Dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, celuloza bakteryjna znalazła zastosowanie, szczególnie w przemyśle papierniczym, włókienniczym, spożywczym oraz jako biomateriał w medycynie Tab. 1 [7, 15, 18, 19, 20].

Tabela 1

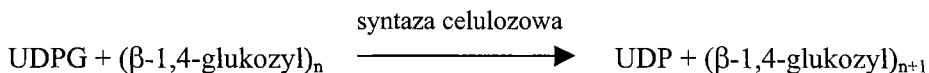
Zastosowanie celulozy bakteryjnej w różnych gałęziach przemysłu.
Application of bacterial cellulose in the different branches of industry.

Przemysł / Industry	Zastosowanie / Application
przemysł spożywczy food industry	<ul style="list-style-type: none"> • produkcja żywności niskokalorycznej (celuloza jako niskokaloryczny zamiennik tłuszczu), • czynnik stabilizujący zawiesiny, • wypełniacz poprawiający jakość żywności o konsystencji mazistej, • sporządzanie deserów smakowych np.. filipiński „Nata de coco” • inne artykuły sporządzane przy udziale celulozy bakteryjnej jako dodatku: pasztety, tofu (serek sojowy), kamaboko (gotowana pasta rybna), nadzienie do hamburgerów i kiełbasek, • nośnik w procesach immobilizacji enzymów i komórek drobnoustrojów, • zastosowanie błon celulozowych jako membran do ultrafiltracji i dializy.
przemysł papierniczy pulp industry	<ul style="list-style-type: none"> • produkcja szlachetnych gatunków papieru, • konserwacja dokumentów oraz dzieł sztuki, • produkcja membran głośnikowych.
medycyna medicine	<ul style="list-style-type: none"> • zastosowanie celulozy bakteryjnej jako sztucznych organów, • zastosowanie błon celulozowych jako materiałów opatrunkowych, • produkcja różnego typu tamponów chirurgicznych, podpasek higienicznych, pieluszek i innych materiałów sanitarnych.
przemysł włókienniczy i chemiczny textile and chemical industry	<ul style="list-style-type: none"> • modyfikacja za pomocą celulozy bakteryjnej typowych tkanin i dzianin syntetycznych, • surowiec do chemicznego przetwarzania na włókna celulozowe, • produkcja wysoko adsorpcyjnych materiałów służących do oczyszczania niektórych rodzajów ścieków przemysłowych, • produkcja niezwykle wytrzymałych kompozytów, o własnościach mechanicznych porównywalnych z własnościami tytanu.

Mechanizm biosyntezy celulozy

Bezpośrednim prekursorem w procesie biosyntezy celulozy jest glukoza w formie aktywnej urydynodifosforanowej pochodnej – UDPG, która w reakcji katalizowanej przez syntazę celulozową jest przenoszona na cząsteczkę primera – $(\beta\text{-1,4-glukozy})_n$ i

wiąże się anomerycznym węglem z grupą hydroksylową przy C-4 reszty glukozyłu, zgodnie z zapisem [28]:



Liczbę i stopień polimeryzacji syntetyzowanych łańcuchów glukanowych, pochodzących z jednego miejsca wydzielania komórki bakteryjnej, warunkują kompleksy enzymatyczne, zwane stacjonarnymi kompleksami terminalnymi, uważane do dziś za właściwą syntazę celulozową [25, 14, 13].

Kompleksy terminalne w liczbie 50–80 ułożone są w błonie komórkowej wzdłuż długiej osi komórki liniowo i komplementarnie do układu kanałów będących miejscem wydzielania elementarnych mikrofibryli celulozowych.

Biochemiczne badania mechanizmu regulacji syntezy celulozy wykazały, że aktywność syntazy celulozowej osiąga wysoki poziom, pod warunkiem obecności allosterycznego efektora, którym jest cykliczny nukleotyd – diguanozynomonofosforan (c-di-GMP).

W oparciu o obserwacje w mikroskopie elektronowym ustalono, że bakterie *Acetobacter xylinum* syntetyzują wysoce krystaliczne mikrofibryle celulozowe i wydzielają je na zewnątrz w postaci wstążki, która pozostaje związana z komórką [25, 13].

Wstążka celulozowa złożona z około 1000 łańcuchów β -glukanowych wykazuje szerokość rzędu 40±60 nm, grubość około 10 nm i długość około 10 μm (Fot. 1).



Fot. 1. Mikrofibryle celulozowe wydzielane przez bakterie *Acetobacter xylinum*.

Fig. 1. Cellulose microfibriles produced by *Acetobacter xylinum*.

Subelementarne fibryle celulozowe, wydzielane przez sąsiednie kanały w lipopolisacharydowej warstwie ściany komórkowej, stanowiące układ równoległe ułożonych 10 do 15 łańcuchów glukanowych nie ulegających dysocjacji, łącząc się wiązaniami wodorowymi, tworzą elementarne krystaliczne mikrofibryle grubości 3 nm. Powstałe elementarne mikrofibryle asocjując wiązaniami wodorowymi formują wiązki, a następnie wstążki. W konsekwencji powstaje charakterystyczna krystaliczna struktura celulozy [9].

Wstążki celulozowe pochodzące z wielu komórek bakteryjnych tworzą misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli statycznej szczepu *Acetobacter xylinum* formuje na powierzchni ciekłej pożywki zwartą, galaretowatą błonę o grubości dochodzącej do kilku centymetrów [25, 27].

Badania mechanizmu wydzielania fibryli celulozowych przez komórki bakterii *Acetobacter xylinum*, prowadzone w obecności związków chemicznych (Calcofluor, karboksymetyloceluloza, alkohol poliwinylowy), uniemożliwiających tworzenie pomiędzy łańcuchami glukanowymi wiązań wodorowych warunkujących krystaliczność struktury polimeru, dowiodły, że polimeryzacja i krystalizacja są procesami ściśle połączonymi ale zachodzącymi niezależnie od siebie [1, 13].

Warunki biosyntezy celulozy bakteryjnej i stosowane metody

Produkcja celulozy na skalę przemysłową jest jeszcze niewielka, głównie ze względu na trudności związane z wyselekcjonowaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wgłębnej, a także ze względu na wysokie koszty składników podłoża.

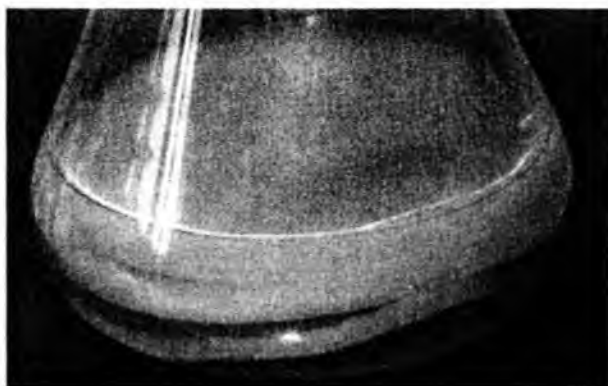
Generalnie, szczepy rodzaju *Acetobacter* zdolne są do biosyntezy celulozy w warunkach stacjonarnych, tworząc na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą, wielowarstwową błonę, uformowaną z misternie splecionej sieci mikrofibryli celulozowych i komórek bakteryjnych (Fot. 2). W hodowlach statycznych w zależności od składu podłoża hodowlanego i aktywności szczepu uzyskuje się od 0,1 do 1,0 g suchej masy celulozowej ze 100 ml podłoża.

Badania nad czynnikami wpływającymi na produkcję celulozy przez szczep *Acetobacter xylinum* w hodowli stacjonarnej wykazały, że o wydajności procesu syntezy decyduje głównie źródło węgla [17]. Stosowano podłoża z 7% zawartością cukrowca (fluktozy, glukozy, sacharozy lub laktozy). I tak po 16 dniach hodowli w 30°C, na podłożu z fruktozą otrzymywano celulozę w ilości 7,38 g/l, z glukozą – 1,0 g/l, z sacharozą – 5,25 g/l, z laktozą – 1,62 g/l.

Badania dynamiki nagromadzania masy celulozowej wykazały, że około 70% produktu tworzy się po 8 dniach hodowli w podłożach zawierających 1% źródła węgla. Inni autorzy [4] badający proces syntezy celulozy wykazali, że około 75% tego produktu nagromadza się podczas pierwszych 9 dni inkubacji i następnie ulega znacznemu

spowolnieniu. Z badań prowadzonych przez Embuscado [5] nad wpływem źródła azotu wynika, że stosowanie azotu organicznego w postaci, ekstraktu drożdżowego lub peptonu, warunkuje uzyskanie najwyższych wydajności procesu. Wpływ różnych czynników na biosyntezę celulozy bakteryjnej w warunkach stacjonarnych badali Embuscado i wsp. [6], stosując matematyczną metodę optymalizacji podłoża hodowlanego i warunków prowadzenia procesu, które pozwoliły na uzyskanie około 13 g celulozy/l. Ustalono następujące warunki biosyntezy celulozy:

- | | | |
|--|--|---|
| • fruktoza | 24,8 g/l, | |
| • sacharoza | 76,5 g/l, | |
| • ekstrakt drożdżowy | 3 g/l (nie optymalizowano), | |
| • pepton | 0,08% (w przeliczeniu na azot ogólny), | |
| • pH | 4,49, | |
| • temperatura | 29,3°C, | |
| • K ₂ HPO ₄ | 1,0 g/l, | } (ostatnie trzy składniki nie były optymalizowane) |
| • MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g/l, | |
| • NaCl | 0,1 g/l. | |



Fot. 2. Błona celulozowa wytworzona w warunkach hodowli stacjonarnej.

Fig. 2. Cellulose film produced in stationary culture conditions.

W wyniku optymalizacji wyeliminowano nieorganiczne źródło azotu. Otrzymany wynik biosyntezy jest dotychczas najlepszy spośród publikowanych wyników uzyskiwanych w hodowlach stacjonarnych.

Pomimo tych dość obiecujących danych, sposób hodowli stacjonarnej zalicza się do metod mało wydajnych i są one zastępowane metodami wgłębnymi w fermentorach. Generalnie należy stwierdzić, że wybór metody hodowli podyktowany jest praktyczną przydatnością wytworzonego produktu, który może być np. w formie błony (Fot. 3), rurek lub pulpy.



Fot. 3. Celuloza bakteryjna w formie błony o wymiarach 1m × 0,5m, wytworzona w warunkach hodowli stacjonarnej w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ.

Fig. 3. Bacterial cellulose film (1m × 0,5m) produced in stationary culture in Technical Biochemistry Institute of Łódź University of Technology.

Celulozę w formie rękawa otrzymali Sattler i Fiedler [26], prowadząc hodowlę bakterii *Acetobacter xylinum* w fermentorze poziomym, zaopatrzonym w obracający się wałek, zanurzony do połowy w podłożu hodowlanym. Polisacharyd nagromadzał się na wałku lub na szeregu współosiowych tarcz, formując po 5 dniach hodowli, mocno żelowaną błonę o grubości 2–3 centymetrów.

Proces biosyntezy celulozy może być również prowadzony metodą dwustopniową: wgłębną i stacjonarną. Okiyama i wsp. [16] pierwszy etap hodowli prowadzili w fermentorze w czasie 3 dni, po czym porcje cieczy przenosili na tace i w II etapie kontynuowali proces w warunkach stacjonarnych.

Otrzymywanie celulozy bakteryjnej w formie rurek podyktowane było głównie możliwością jej wykorzystania jako zamienników takich organów, jak: tchawica, moczowody, jelita, naczynia limfatyczne i krwionośne [18]. Sposób otrzymywania takiej formy celulozy polegał na hodowli bakterii *Acetobacter xylinum* w wewnętrznej i/lub zewnętrznej części węży celofanowych, teflonowych, porcelanowych, sporządzanych z tkanych lub nietkanych materiałów, z możliwością doprowadzenia tlenu. W takich

warunkach na powierzchni nośnika formuje się warstwa celulozy o grubości około 0,01 do 20 mm. Drugi sposób polegał na hodowli bakterii w zbiorniku, w warunkach stacjonarnych, w czasie 50 dni. Wytworzona w tym czasie błona celulozowa o grubości około 3 centymetrów, po uprzednim powleczeniu glicerolem i zamrożeniu w temp. -80°C , wykorzystana była do sporządzania rurek przy użyciu korkoboru. Trzeci sposób polegał na hodowli bakterii w przestrzeni między ściankami dwóch rurek o różnych średnicach. Otrzymano w ten sposób rurkę celulozową o średnicy wewnętrznej 2–3 mm, którą można wykorzystać jako sztuczne naczynie krwionośne.

Możliwość szerszego zastosowania celulozy bakteryjnej w przemysłach chemicznym, papierniczym czy włókienniczym uwarunkowana jest dostępnością i ceną. Spełnienie tych wymogów umożliwia produkcja polimeru w fermentorach, z wykorzystaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach wglębnych na tanich surowcach odpadowych [17, 30].

Hodowla wglębna może być prowadzona metodą jednoetapową, podczas której następuje wzrost mikroorganizmów i produkcja celulozy. W metodzie tej można stosować trzy sposoby prowadzenia procesu biosyntezy: okresowy, okresowy z zasilaniem, ciągły.

Metoda dwuetapowa produkcji celulozy polega na stworzeniu warunków, w I etapie dla wzrostu mikroorganizmu i w II etapie dla właściwego procesu biosyntezy.

W niektórych hodowlach wglębnych, stosowany do biosyntezy celulozy bioreaktor musi być zaopatrzony w elementy pozwalające na związanie drobnoustroju i stopniowe formowanie mikrofibryli. Udowodniono bowiem, że celuloza formuje się z dużymi trudnościami w wolnej fazie ciekłej, pozbawionej miejsc wiązania, takich jak: grzebienie, łopatki, okładziny, elementy wypełniające [17]. W pewnych przypadkach do pożywki w bioreaktorze wprowadzano różnego typu nierozpuszczalne w wodzie mikrocząstki: piasek morski, ziemię okrzemkową lub szklane kulki. Stężenie dodawanych mikrocząsteczek było optymalizowane wraz ze stopniem napowietrzania. Wydajność biosyntezy celulozy w tak prowadzonym procesie, wzrosła trzykrotnie (z 1,1 do 3,6 g/l) w stosunku do wydajności celulozy uzyskiwanej w normalnych warunkach (bez obecności mikrocząstek) [30]. Ten wzrost wydajności syntezy celulozy jest według autorów rezultatem powstania wokół mikrocząstek swoistego biofilmu ograniczającego dopływ tlenu. Według ogólnie akceptowanej teorii Schramma i Hestrina [27] produkcja celulozy przez *Acetobacter xylinum* jest niezbędna dla komórek do osiągnięcia bogatej w tlen granicy faz: powietrze – pożywka. W wyżej wymienionym procesie wysokie stężenie rozpuszczonego tlenu, rzeczywiście nie doprowadziło do spadku produkcji celulozy. Konsekwentnie jednakże, rolę tlenu należy bardziej wiązać ze wzrostem syntezy kwasów ketoglukonowego i glukonowego, aniżeli z bezpośrednim oddziaływaniem na syntezę celulozy. Pozytywny efekt, uzyskany poprzez dodanie mikrocząstek, był więc według autorów spowodowany wytworzeniem się wokół po-

wierzchni tych cząstek lokalnych nisz pozbawionych tlenu, co dało rezultat w postaci faworyzowania procesu tworzenia celulozy, aniżeli oksydacji glukozy do kwasów keto- i glukonowego [30].

Jak już wcześniej wspomniano, głównym źródłem węgla dla wzrostu bakterii i biosyntezy celulozy jest glukoza lub fruktoza. Istota kompozycji pożywki, a szczególnie rodzaj źródła węgla, staje się jasna przy wzięciu pod uwagę metabolizmu bakterii *Acetobacter xylinum*. Cząsteczka glukozy jako źródło węgla jest, pomijając rolę źródła energii oraz prekursora syntezy celulozy, aktywnie przetwarzana przez bakteryjną dehydrogenazę do kwasów keto- i glukonowego. Zjawisko to nie tylko obniża kompletną wydajność celulozy, ale również obniża pH pożywki do wartości niekorzystnych dla procesu syntezy celulozy. Z tego powodu, stosując wysokie początkowe stężenie glukozy, mające na celu uzyskanie wyższej produktywności, nie otrzymujemy proporcjonalnie wyższej produkcji celulozy. Biorąc to pod uwagę, konieczne jest zastosowanie procesu fermentacji z kontrolowanym pH. Vandamme i wsp. [30] rozwinęli proces hodowli obejmujący kontrolę pH pożywki *in situ*, przy wykorzystaniu kwasu octowego, jako dodatkowego substratu dla hodowli szczepu *Acetobacter sp.* LMG 1518. Racjonalność takiego postępowania wiązała się ze zdolnością *Acetobacter sp.* do utleniania kwasu octowego do CO₂ i wody, generując przy tym dodatkowe ATP i faworyzując pożądany zakres pH. Aczkolwiek, kwas octowy nie prowadzi bezpośrednio do formowania celulozy, ATP pochodzące od kwasu octowego może zachować część glukozy, normalnie wykorzystywaną do syntezy ATP, prowadząc do bardziej wydajnego procesu syntezy celulozy. Co ciekawe, katabolizm kwasu octowego prowadzi równocześnie do wzrostu pH, co może przeciwdziałać spadkowi pH spowodowanemu formowaniem się kwasów keto- i glukonowego. Po przeprowadzeniu optymalizacji podłoża, Vandamme i wsp. [30], stosując następującą mieszaninę cukrów: fruktoza (70 g/l), glukoza (35 g/l) i kwas octowy (7,5 g/l) uzyskali w warunkach hodowli stacjonarnej wzrost do 28,4 g celulozy/l, co daje produktywność 6,7 g celulozy/l/dzień. Początkowa wartość pH = 5,5, która była optymalna dla syntezy celulozy, mogła być utrzymywana na stałym poziomie w czasie procesu fermentacji, co ilustruje korzystną zdolność buforowania wykazywaną przez kwas octowy, a związaną z obniżeniem się syntezy kwasów keto- i glukonowego [30].

Bardzo istotną kwestią w procesach hodowli *Acetobacter xylinum* jest również ustalenie sposobu szczepienia pożywki, zarówno w warunkach hodowli stacjonarnej, jak i wglębnej. Organizmy, takie jak *Acetobacter*, które wytwarzają duże ilości celulozy są dość trudne do przeniesienia z jednego inokulum do kolejnego, ponieważ bardzo często komórki zostają uwikłane w grubą błonę celulozową. W produkcji celulozy na dużą skalę, konieczne jest użycie dużego inokulum. Brown [2] w swoim patencie zaproponował wykorzystanie preparatów celulaz, które dodane w odpowiednim stężeniu do pożywki inokularnej, rozkładały otoczki celulozowe wokół komórek, przyczyniając

się do wzrostu ilości wolnych komórek. W obecności celulaz nie formuje się błona, a rozwija się typowa zawiesina komórek ($10 \cdot 10^7$ w porównaniu do $112 \cdot 10^5$ po 30 godzinach w przypadku normalnej hodowli).

Kolejnym istotnym aspektem w procesie biosyntezy celulozy jest ustalenie sposobu mieszania i napowietrzania, który nie powodowałby efektu burzliwości, niekorzystnie wpływającego na proces polimeryzacji i krystalizacji, a także na wydajność produktu. Stosując szczep *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* ATCC 2178, autorzy patentu WO 88/09381 [7] otrzymali 10 g masy celulozowej/l/dzień w fermentorze o pojemności 300 l, prowadząc proces w czasie 45 godzin, w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 60 rpm i napowietrzaniu 0,6 vvm.

Wytwarzanie celulozy w dużej skali, w hodowlach z ciągłym mieszaniem napotyka na szereg trudności, z których największą jest niestabilność kultury przejawiająca się tendencją do spontanicznej mutacji w kierunku szczepów nieaktywnych, tzw. *Cel* [21, 22]. Szczep niestabilny może być z powodzeniem stosowany w hodowlach statycznych, gdzie wzrost bakterii i synteza celulozy przebiega w warunkach tlenowych na granicy faz: pożywka – powietrze. W warunkach hodowli wstrząsanej, w której wzrost bakterii ograniczony jest szybkością rozpuszczania się tlenu oraz następuje agregacja komórek syntetyzujących celulozę (co utrudnia dostęp tlenu), faworyzowane są komórki nieaktywne *Cel*.

Autorzy patentu 5144021 US [21], stosując metodę mutagenizacji, ulepszyli wiele szczepów *Acetobacter*, uzyskując kultury zachowujące pełną stabilność podczas długotrwałych hodowli, przebiegających w warunkach mieszania i napowietrzania. Ponadto, wyselekcjonowali oni dwa szczepy charakteryzujące się znacznie obniżoną zdolnością konwersji glukozy do kwasów glukonowego i ketoglukonowego. Stosując takie szczepy autorzy patentu uzyskiwali przeciętnie 0,1 g celulozy w formie kuleczek z 1 litra podłoża, w czasie 1 godziny, niezależnie od sposobu prowadzenia procesu w fermentorach [11, 21].

Czynnikiem decydującym o opłacalności produkcji celulozy bakteryjnej jest również koszt i dostępność składników podłoża hodowlanego. Stosowano węglowodany pochodzenia roślinnego, zbudowane z heksoz, a szczególnie glukozy i/lub fruktozy, a także pochodne innych heksoz lub pentoz. Dla szczepów „inwertazo⁺” stosuje się surowce zawierające sacharozę, jak np.: sok cukrowniczy, melasę, syropy, a dla szczepów „inwertazo⁻” – hydrolizaty tych surowców.

Substraty skrobiowe, jak: mąki, amylodekstryny, dekstryny mogą być wykorzystywane dla szczepów „amylazo⁺”. W przeciwnym przypadku można stosować enzymatyczne hydrolizaty skrobi [17].

W przypadku niektórych szczepów korzystne jest dodanie do podłoża etanolu lub glicerolu, mleczanu, octanu lub mannitolu, kwasu cytrynowego, które mogą stymulować produkcję celulozy [29].



Fot. 4. Celuloza bakteryjna w formie kuleczek wytworzona w warunkach hodowli wglębnej.
Fig. 4. The balls of bacterial cellulose produced in agitated culture.

Właściwości celulozy bakteryjnej i jej praktyczne wykorzystanie

Celuloza bakteryjna wytworzona w hodowli szczepów rodzaju *Acetobacter* charakteryzuje się wysoką czystością i w przeciwieństwie do celulozy roślinnej nie wymaga kosztownego i skomplikowanego procesu oczyszczania.

Etapy oddzielania i oczyszczania celulozy obejmują: filtrację, wyżymanie, przemywanie wodą, usunięcie komórek bakterii związanych z fibrylami celulozowymi lub na nich zaadsorbowanymi. Celulozę pozbawia się tych komórek stosując najczęściej merceryzację wodorotlenkiem sodu o stężeniu 1–4%, w temperaturze 60 do 100°C, w czasie kilku lub kilkunastu godzin, lub poprzez traktowanie kwasami organicznymi, jak np. kwasem octowym 5–8%, najlepiej w 100°C, w czasie 1 godziny [17, 18, 21].

Celuloza bakteryjna charakteryzuje się wysoką zawartością wody, w której 0,3% stanowi woda związana i 98,8% – woda wolna. Woda ta jest utrzymywana w strukturze celulozy dzięki słabym oddziaływaniom kapilarnym. Traktowanie celulozy lepкими roztworami, np. alkoholami cukrowymi powoduje pęcznienie celulozy i jej zmiękczenie. Tekstura tak otrzymanego produktu przypomina teksturę owoców, lub fibrylną strukturę mięśnia. Taka forma jest wykorzystywana na Filipinach do sporządzania deserów smakowych o nazwie „Nata” [15]. Celulozę bakteryjną w postaci pasty zastosowano jako czynnik stabilizujący zawiesiny, jako wypełniacz wzmacniający fizyczną strukturę łamliwych hydrożeli, jako wypełniacz poprawiający jakość żywności o konsystencji mazistej, zmniejszając ich lepkość. Celuloza może być też stosowana jako zamiennik tłuszczu oraz wypełniacz obniżający kaloryczność słodzonych produktów, np. dżemów [15].

Charakterystyczną właściwością celulozy bakteryjnej, różniącą ją od celulozy roślinnej jest wysoce uporządkowana struktura, utworzona przez mikrofibryle w kształcie wstążki o szerokości poniżej 100 nm. Struktura niezwykle cienkich włókienek splecionych ze sobą decyduje o bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni, umożliwiającej adsorbowanie 100-krotnej (lub więcej) ilości wody w stosunku do jej suchej masy [15].

Zdolność do wiązania wody i tworzenia wiązań z włóknami celulozowymi innego pochodzenia umożliwia zastosowanie celulozy w produkcji szlachetnych gatunków papieru. Powlekając papier zawieszoną celulozą bakteryjną o wielkości cząstek 100–125 μm , w ilości 0,4–1,2%, w obecności czynnika dyspergującego, jak np. CMC, uzyskuje się produkt przewyższający jakością papier powlekany skrobią [22].

Dodatek celulozy bakteryjnej do włókien nieorganicznych (węglowych, glinowych), pozwala na uzyskanie produktu o zwiększonej wytrzymałości na zrywanie [29]. Impregnowanie bakteryjną celulozą materiałów hydrofobowych, jak np. poliestrowych, polipropylenowych, nadaje im doskonałą hydrofilowość, wysoką wytrzymałość, co stwarza możliwość ich zastosowania jako materiałów opatrunkowych [23].

Właściwości błon celulozowych formowanych podczas wzrostu bakterii na powierzchni ciekłych pożywek, w szczególności wysoka zawartość α -celulozy (powyżej 90%), znaczna smukłość mikrofibryli celulozowych wyrażona stosunkiem długości do średnicy wynosząca 200–500, średnica porów poniżej 3000 nm, porowatość 50–93%, wytrzymałość dynamiczna – 16–18 GPa, pozwalają na zastosowanie takich błon jako membran do ultrafiltracji i dializy [24].

Dobrze rozwinięta powierzchnia, duża trwałość i wysokie zdolności adsorpcyjne celulozy bakteryjnej sprawiają, że jest ona stosowana jako nośnik do immobilizacji enzymów i komórek drobnoustrojowych.

Błony celulozowe sprasowane w temp. 130°C, przyjmujące formę kartonów, stosowano jako stożkowe membrany głośnikowe. Charakteryzowały się one wysokim modułem Younga – 13,6 GPa, gęstością – 1060 kg/m^2 , prędkością rozchodzenia się dźwięku – 3580 m/s, ostrością rezonansu – 29,2. W porównaniu z diafragmami papierowymi, powyższe parametry były znacznie korzystniejsze [29].

Możliwość wykorzystania celulozy bakteryjnej w medycynie, a szczególnie jako sztucznych organów, stwarzają takie jej właściwości, jak: zawartość α -celulozy o wysokiej krystaliczności, wysoka wytrzymałość, bardzo dobra zgodność z żywą tkanką, a w szczególności z krwią. Opracowano sposób hodowli bakterii *Acetobacter xylinum*, pozwalający na wytwarzanie celulozy bakteryjnej w formie rurek o wymaganej średnicy. Otrzymane sztuczne naczynie krwionośne o średnicy wewnętrznej 2 do 3 mm wszczepiono psu, zastępując część aorty i żyły szyjnej. Ocena stanu przylegania skrępeń i prześwitu po 1 miesiącu funkcjonowania naczynia, wypadła bardzo dobrze [18].

Jak już podkreślono, błona celulozowa uformowana na powierzchni ciekłej pożywki w hodowli stacjonarnej, charakteryzuje się wielowarstwową strukturą zbudowa-

ną z sieci mikrofibryli o średnicy poniżej 100 nm, wysoką zawartością wody (około 95%) w przestrzeniach między mikrofibrylami, nadającej jej właściwości żelu, czystością (zawartość α -celulozy powyżej 95%), wytrzymałością, porowatością, elastycznością. Ponadto błony takie, po dokładnym oczyszczeniu nie wywołują działania toksycznego, alergicznego i drażniącego. Stosowane jako opatrunek, stwarzają korzystne warunki gojenia się rany, bowiem nowe badania mechanizmu gojenia się rany wskazują na to, że wilgotne, a nie suche środowisko zapewnia optymalne warunki dla procesów naprawczych [12].

Podsumowanie

Właściwości celulozy bakteryjnej otwierają wiele możliwości jej praktycznego wykorzystania i znajduje to ekonomiczne uzasadnienie przy wzięciu pod uwagę, że jej produkcja może być oparta na tanich surowcach odpadowych przemysłu spożywczego lub farmaceutycznego.

LITERATURA

- [1] Brown R.M., Houghler C.H., Benziman M., White A.R., Cooper K.M.: Proc. Natl., Acac. Sci., USA, 77, 1980, 6678,
- [2] Brown R.M.: „Use of cellulase preparations in the cultivation and use of cellulose-producing microorganisms”, Patent 0258 038, 1988
- [3] Calvin J.R.: Biosynthesis of cellulose, Plant Biochem., J. Priess., 3, 1980, 543,
- [4] Dudman W.: J. Gen. Microbiol., 21, 1959, 312,
- [5] Embuscado M.E., Marks J.S., BeMiller J.N.: Food Hydrocolloids, 8, 1994, 407,
- [6] Embuscado M.E., Marks J.S., Be Miller J.N.: Food Hydrocolloids, 8, 1994, 419,
- [7] Fontana J. D., de Souza A., Fontana C. K., Torriani J.L.: Appl. Biochem. Biotech., 24/25, 1990, 253,
- [8] Geyer U., Klemm D., Schmauder H.P.: Acta Biotechnol., 14, 1994, 261,
- [9] Haighler C.H.: Cellulose chemistry and its applications, Eds. Nevell R.R., Zerionian S.H., Ellis Horwood C.H. Ltd, 1985, 151,
- [10] Kai A., Xu P.: Polymer J., 22, 11, 1990, 955,
- [11] Kent R.A., Stephens R.S., Wetsland J.A.: Food Technology, 5, 1991, 108,
- [12] Kleczyński S., Niedźwiecki T, Brzeziński K.: Polimery w medycynie, XY, 1, 2, 55, 1986,
- [13] Kudlicka K.: Postępy biologii komórek, 16, 1989, 197,
- [14] Lin F.C., Brown R.M., Cooper J.B., Dehner D.P.: Science, 230, 1985, 822,
- [15] Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S.: Food Hydrocolloids, 6, 1993, 493,
- [16] Okiyama A., Shirac H., Kano H., Yamanaka S.: Food Hydrocolloids, 6, 1992, 471,
- [17] Patent PCT/FR88/00266,
- [18] Patent EP 0396 344 A2, 1990,
- [19] Patent EP 0 200 409 A2, 1986,
- [20] Patent WO 92/07946, 1992,
- [21] Patent 5, 144, 021, USA, 1992,

- [22] Patent PCF , US 92/0942,
- [23] Patent 4, 919, 753, 1990,
- [24] Patent JP 1-193335A, 1989,
- [25] Ross P., Mayer R., Benziman M.: *Microbiol. Rev.*, **55**, 1991, 35,
- [26] Sattler K., Fiedler S.: *Zentralbl. Microbiol.*, **145**, 1990, 247,
- [27] Schramm M., Hestrin S.: *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 1954, 123,
- [28] Swissa M., Aloni Y., Weinhausen H., Benziman M.: *J. Bacteriology*, **143**, 1980, 1142,
- [29] Takai M., Tsuta Y., Watanabes S.: *Polymer J.*, **7**, 2, 1975, 137,
- [30] Vandamme E.J., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K., De Wulf P.: *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 1998, 93,

BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE AND ITS POTENTIAL APPLICATION

S u m m a r y

Commercial scale production of microbial cellulose has not been significant up to now because of the difficulties connected with a proper selection of high-active strains, which would be able to synthesise cellulose in an agitated culture, and with regard to the cost of nutrient medium components.

Investigation on cellulose biosynthesis by *Acetobacter xylinum* proved that the polysaccharide is secreted extracellularly as ribbons creating meticulously woven webs, that under stationary culture conditions form jelly-like pellicles at a surface of liquid media. Commercial applications of bacterial cellulose preparations depend on their properties. It can be applied in the pulp industry, textile industry, food industry, and in medicine. ☒