

Celuloza bakteryjna — biosynteza i zastosowanie

Alina Krystynowicz

Marianna Turkiewicz

Elżbieta Dryńska

Edward Galas

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wstęp

Jedną z dziedzin biotechnologii rozwijającą się w ostatnich latach bardzo dynamicznie jest mikrobiologiczna synteza polimerów: białek, polisacharydów, a także innych liniowych związków wielocząsteczkowych, np. poliestrów (1,2). Egzopolisacharydem, który może być otrzymywany na drodze mikrobiologicznej, jest oprócz dekstranu, pululanu, ksantanu, indikanu, kurdlanu i skleroglukanu — celuloza (2-7). Zdolnością do jej biosyntezy charakteryzują się bakterie rodzajów: *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* i inne (7-9). Najbardziej wydajnie wytwarzają celulozę gramujemne bakterie octowe — *Acetobacter aceti* i *Acetobacter xylinum* (7,8).

Bakterie te stały się przedmiotem intensywnych badań, zapoczątkowanych przez Hestrina i Colvina (4,5,10), które pozwoliły wyjaśnić mechanizm biosyntezy celulozy, strukturę polimeru i jego funkcję komórkową (7-11). Zagadnienia te zostaną omówione w dalszych częściach artykułu.

Mikrofibryle celulozowe, wydzielane na zewnątrz komórek bakterii w postaci wstążek, tworzą misternie splecioną i silnie uwodnioną sieć, która w warunkach hodowli stacjonarnej szczepów *A. xylinum* i *A. aceti* formuje na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą błonę o grubości dochodzącej nawet do 2 cm (2-15). Błona ta po oczyszczeniu i wysuszeniu daje produkt, przypominający cienki pergaminowy papier o grubości 0,01 – 0,5 mm, będący prawie czystą (w 97%), wysokokrystaliczną (w ok. 60%) α -celulozą o stopniu polimeryzacji 2000-6000 (16-19). Charakteryzuje się ona doskonale rozwiniętą powierzchnią, elastycznością i dużą wytrzymałością dynamiczną, którą można

zwiększyć, stosując prasowanie, wyciskanie lub walcowanie błon w określonym kierunku, prowadzące do odpowiedniej orientacji włókienek celulozy w otrzymanym materiale.

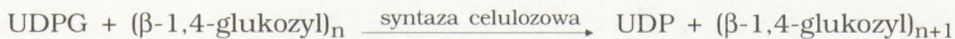
Dzięki swym wyjątkowym właściwościom, celuloza bakteryjna znalazła zastosowanie w przemyśle papierniczym, włókienniczym i spożywczym, a także jako biomateriał, w medycynie (20,21). Wprowadziła ją na rynek amerykańska firma Weyerhaeuser Co pod handlową nazwą Cellulon^R, która do jej produkcji wykorzystuje zrekombinowany szczep *A. xylinum*, zdolny do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli węgłonej (22).

2. Drogi przemian związków węglowych u *A. xylinum*

W badaniach prowadzonych nad biosyntezą celulozy przez *A. xylinum* wykazano, że polimer ten nagromadza się równolegle ze wzrostem drobnoustroju, niezależnie od stosowanego źródła węgla (8,23). Analizując drogi przemian różnych związków węglowych znakowanych węglem ¹⁴C i śledząc inkorporację tego atomu do syntetyzowanego polimeru ustalono, że u tych bakterii funkcjonują dwa amfiboliczne szlaki: szlak heksozomonofosforanowy, w którym utlenia się węglowodany i cykl Krebsa, w którym ulegają utlenieniu kwasy organiczne i pokrewne związki (rys. 1) (7,24,25). Bakterie *A. xylinum* nie metabolizują glukozy w warunkach beztlenowych ze względu na brak fosfofruktokinazy — jednego z najważniejszych enzymów glikolizy, katalizującego przemianę fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bisfosforanu (25). Glukoneogeneza przebiega u nich przy udziale enzymów umożliwiających przemianę związków czterowęglowych w trójwęglowe, gdy jedynymi źródłami węgla są metabolity pośrednie cyklu Krebsa. W ten sposób szczawiooctan przy udziale dekarboksylazy szczawiooctanowej przekształca się w pirogronian (26).

A. xylinum wytwarza również karboksylazę fosfoenolpirogronianową, katalizującą przemianę fosfoenolpirogronianu w szczawiooctan (27).

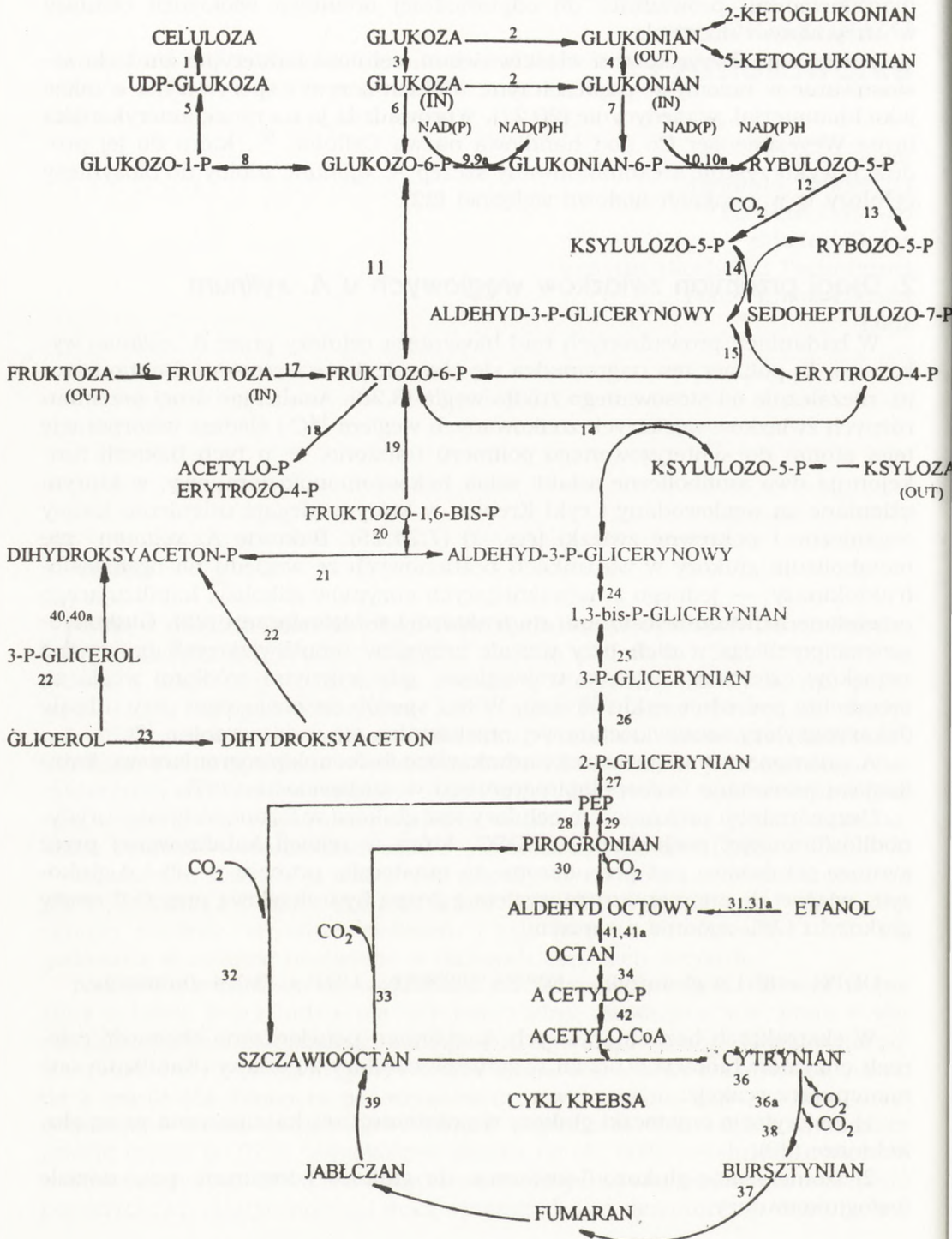
Bezpośrednim prekursorem celulozy jest glukoza w formie aktywnej urydynodifosforanowej pochodnej — UDPG, która w reakcji katalizowanej przez syntazę celulozową jest przenoszona na cząsteczkę primera — (β-1,4-glukozył)_n wiążąc się anomerycznym węglem z grupą hydroksylową przy C-4 reszty glukozyli (28), zgodnie z zapisem:



W ekstraktach bezkomórkowych *A. xylinum* potwierdzono obecność czterech enzymów biorących udział w syntezie celulozy z glukozy. Katalizują one następujące reakcje:

1) fosforylację cząsteczki glukozy w położeniu C-6, katalizowaną przez glukokinazę (29),

2) izomeryzację glukozo-6-fosforanu do glukozo-1-fosforanu przy udziale fosfoglukomutazy,



3) syntezę UDP-glukozy (UDPG) przy udziale urydililotransferazy glukozy-1-fosforanowej,

4) syntezę celulozy przez syntazę celulozową (30).

Podstawową rolę w syntezie celulozy pełni urydililotransferaza glukozy-1-fosforanowa. Potwierdzono to w badaniach mutantów *A. xylinum* Cel⁻ pozbawionych zdolności biosyntezy celulozy, u których nie wykazano aktywności tego enzymu (31).

3. Syntaza celulozowa

Liczbę i stopień polimeryzacji syntetyzowanych łańcuchów glukanowych, pochodzących z jednego miejsca wydzielania z komórki bakteryjnej, warunkują kompleksy enzymatyczne, zwane stacjonarnymi kompleksami terminalnymi. Są one ułożone w komórce liniowo i komplementarnie w stosunku do tych miejsc. Kompleksy terminalne uważane są do dziś za właściwą syntazę celulozową (7,8,18,32), katalizującą syntezę łańcuchów β -glukanowych. Stosując różnicowe wirowanie struktur subkomórkowych *A. xylinum* w gradiencie stężeń sacharozy, a także reakcje charakterystyczne dla białek membranowych udowodniono, że syntaza celulozowa jest silnie związana z błoną cytoplazmatyczną (33).

Enzym ten, zarówno związany z błoną, jak i oczyszczony, charakteryzuje

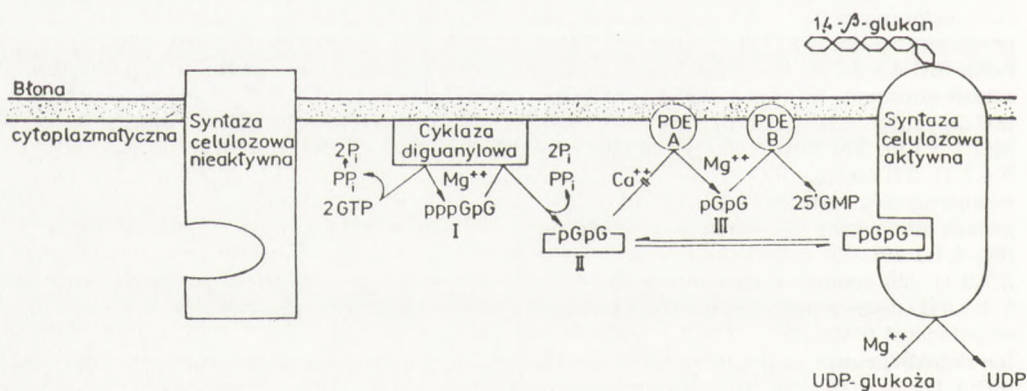
Rys.1. Szlaki przemian związków węglowych u *A. xylinum* (7). OUT — pozakomórkowo, IN — wewnątrzkomórkowo; 1) syntaza celulozowa (EC 2.4.1.12), 2) oksydaza glukozy (EC 1.1.3.4), 3) permeaza glukozy, 4) permeaza glukonianowa, 5) urydililotransferaza glukozy-1-fosforanowa (EC 2.7.7.9), 6) glukokinaza (ATP) (EC 2.7.1.2), 7) glukonokinaza (ATP) (EC 2.7.1.2), 8) fosfoglukomutaza (EC 2.7.5.1), 9) dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (NAD), 9a) dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (NADP) (EC 1.1.1.49), 10) dehydrogenaza-6-fosfoglukonianowa (NAD), 10a) dehydrogenaza-6-fosfoglukonianowa (NADP) (EC 1.1.1.43), 11) izomeraza glukofosforanowa (EC 5.3.1.9), 12) 3-epimeraza rybulozy-5-fosforanowa (EC 5.1.3.1), 13) izomeraza rybulozy-5-fosforanowa (EC 5.3.1.6), 14) transketolaza (EC 2.2.1.1), 15) transaldolaza (EC 2.2.1.2), 16) permeaza fruktozy, 17) fruktokinaza (ATP) (EC 2.7.1.4), 18) fosfoketolaza fruktozy-6-fosforanowa (EC 4.1.2.22), 19) difosfataza fruktozy-1,6-bisfosforanu (EC 3.1.3.11), 20) aldolaza fruktozobisfosforanowa (EC 4.1.2.13), 21) izomeraza fosfotriozowa (EC 5.3.1.1), 22) kinaza glicerolowa (EC 2.7.1.30), 23) oksydaza glicerynianowa, 24) dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (EC 1.2.1.9), 25) kinaza fosfoglicerynianowa (EC 2.7.2.3), 26) mutaza 3-fosfoglicerynianu (EC 5.4.2.1), 27) enolaza (EC 4.2.1.11), 28) kinaza pirogronianowa (ATP) (EC 2.7.1.40), 29) dikinaza fosfopirogronianowa (EC 2.7.9.1), 30) dekarboksylaza pirogronianowa (EC 4.1.1.1), 31) dehydrogenaza alkoholowa (EC 1.1.1.1), 31a) oksydaza alkoholowa (EC 1.1.3.13), 32) karboksylaza PEP (EC 4.1.1.49), 33) dekarboksylaza szczawiooctanu (EC 4.1.1.3), 34) kinaza octanowa (ATP) (EC 2.7.2.1), 35) syntaza cytrynianowa (EC 4.1.3.7), 36) dehydrogenaza izocytrynianowa (NAD) (EC 1.1.1.41), 36a) dehydrogenaza izocytrynianowa (NADP) (EC 1.1.1.42), 37) dehydrogenaza burztynianowa (FAD) (EC 1.3.99.1), 38) dehydrogenaza 2-oksoglutaranu (NAD, Co-A) (EC 1.2.4.2), 39) dehydrogenaza jabłczanowa (FAD) (EC 1.1.99.16), 40) dehydrogenaza fosfoglicerolowa (NAD) (EC 1.1.1.8), 40a) dehydrogenaza fosfoglicerolowa (FAD), 41) dehydrogenaza aldehydu octowego (NAD) (EC 1.2.1.10), 41a) dehydrogenaza aldehydu octowego (FAD), 42) acetylotransferaza fosforanowa (EC 2.3.1.8)

się optymalną temperaturą działania, wynoszącą 30°C i optymalnym pH, leżącym w zakresie 7,5 – 8,5. Wykazuje wysokie powinowactwo do UDPG (K_m równe 0,125 mM). Inhibitorami współzawodniczącymi syntazy są: UTP, UDP i UMP, a jej aktywność zależy od jonów Mg^{2+} . Syntaza celulozowa jest glikoproteiną o masie 420 kDa, złożoną z trzech par jednakowych podjednostek o różnych rozmiarach (90, 67 i 54 kDa) (7). Opierając się na badaniach ze znakowanymi c-di-[^{32}P]GMP i [α - ^{32}P]UDPG stwierdzono, że z podjednostką o masie cząsteczkowej 67 kDa wiąże się aktywator (c-di-GMP), z podjednostką 54 kDa specyficzny substrat UDPG. Podjednostka o masie 90 kDa wykazuje śladową zdolność wiązania obu tych substancji (7).

4. Regulacja syntezy celulozy

W badaniach prowadzonych nad mechanizmem regulacji syntezy celulozy, w których wykorzystano preparaty błon, zawierające związaną z nimi syntazę celulozową wykazano, że aktywność tego enzymu może osiągnąć wysoki poziom, porównywalny z aktywnością nienaruszonej komórki, pod warunkiem obecności allosterycznego efektora, którym jest cykliczny nukleotyd- diguanozynomonofosforan (c-di-GMP) (11). Wykrycie tego nukleotydu przyczyniło się do sformułowania koncepcji mechanizmu regulacji syntezy celulozy u *A. xylinum* (rys. 2) (7).

Cykliczny di-GMP powstaje w komórce z 2 cząsteczek GTP (intermediatem jest liniowy diguanozynotrifosforan — pppGpG), w reakcji katalizowanej przez cyklazę diguanylową, aktywowaną jonami Mg^{2+} i silnie związaną z błoną cytoplazmatyczną. W metabolizmie c-di-GMP biorą też udział inne enzymy zlokalizowane w błonie, tj. fosfodiesterazy A i B. Fosfodiesteraza A (PDEA) rozszczepia aktywną cykliczną formę nukleotydu (c-di-GMP), uwalniając nie-



Rys. 2. Proponowany model regulacji syntezy celulozy u *A. xylinum* (7); I — liniowy diguanozynotrifosforan, II — cykliczny diguanozynomonofosforan, III — liniowy diguanozynomonofosforan.

aktywny liniowy dimer (pGpG). Dimer ten w reakcji katalizowanej przez fosfodiesterazę B (PDEB) ulega rozkładowi do 2 cząsteczek 5'GMP. Aktywność fosfodiesterazy A można regulować stosując różne stężenia jonów Ca^{2+} , które są silnymi inhibitorami tego enzymu. Ich stężenie decyduje zatem o szybkości przemiany c-di-GMP do nieaktywnej formy liniowej (pGpG) i co z tym się wiąże, o poziomie aktywności syntazy celulozowej.

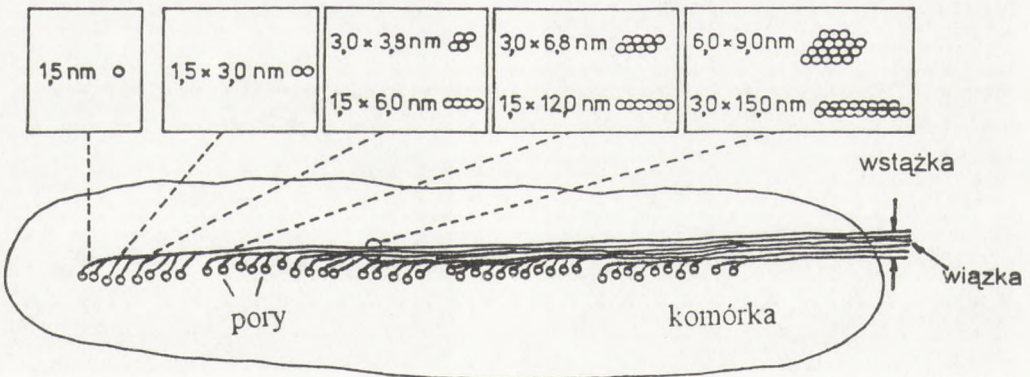
Przemiana liniowego dinukleotydu pGpG do 5'GMP, katalizowana przez fosfodiesterazę B, jest niezależna od jonów Ca^{2+} , co wskazuje, że enzymy degradujące c-di-GMP są dwoma różnymi białkami enzymatycznymi. Stężenie c-di-GMP w komórkach bakterii syntetyzujących celulozę jest zatem regulowane przez trzy enzymy związane z błoną cytoplazmatyczną: cyklazę diguanilową oraz fosfodiesterazy A i B.

Ten allosteryczny efektor wiążąc się w sposób odwracalny z regulacyjną podjednostką syntazy celulozowej, wywołuje zmiany konformacyjne, ułatwiające asocjacje protomerów, w wyniku czego następuje wzrost reaktywności aktywnego miejsca enzymu (11).

5. Mechanizm wydzielania fibryli celulozowych

Prowadząc obserwacje w mikroskopie elektronowym dowiedziono, że *Acetobacter xylinum* i *Acetobacter aceti* syntetyzują mikrofibryle celulozowe i wydalają je na zewnątrz w postaci wstążki, która pozostaje związana z komórką (11).

Wstążka celulozowa złożona z około 1000 łańcuchów glukanowych ma szerokość rzędu 40-60 nm, grubość około 10 nm i długość około 10 μ m. Subelementarne fibryle celulozowe, o grubości ok. 1,5 nm, wydzielane są przez specjalne kanały (50-80 na komórkę) w lipopolisacharydowej warstwie ściany komórkowej, ułożone w równych odstępach wzdłuż komórki (34). Fibryle te są złożone z 10 do 15 równoległych ułożonych łańcuchów glukanowych,

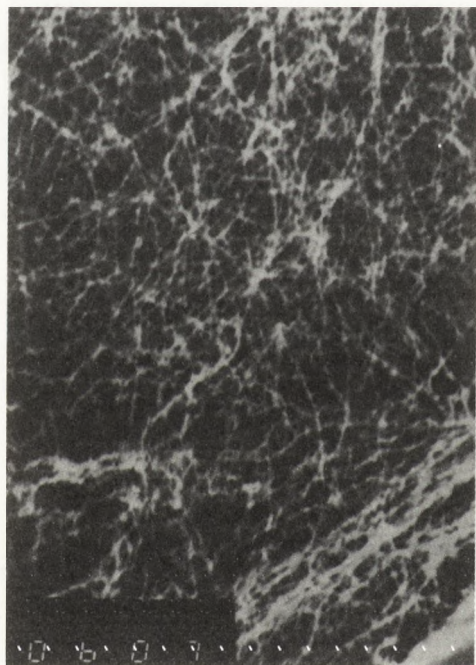


Rys. 3. Model formowania wstążki celulozowej u *A. xylinum* (35).

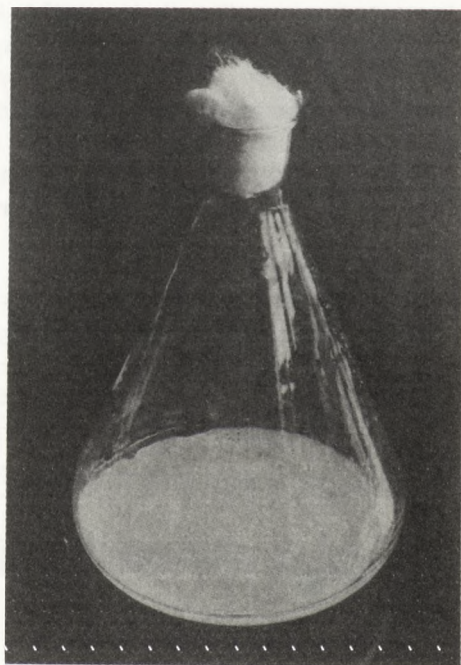
nie ulegających dysocjacji. Elementarne, krystaliczne mikrofibryle, o grubości 3,0 nm tworzą się w wyniku połączenia wiązaniami wodorowymi mikrofibryli subelementarnych, pochodzących z sąsiednich kanałów. Łącząc się dalej wiązaniami wodorowymi formują one wiązki, a te z kolei wstążkę (rys. 3) (35). Wstążki celulozowe pochodzące z wielu komórek splatają się ze sobą (fot. 1), formując zwartą błonę na powierzchni pożywki hodowlanej (fot. 2) (13,36).

Pojedyncza komórka *A. xylinum* może polimeryzować do 200 000 cząsteczek glukozy w czasie 1 sekundy (37).

Polimeryzację i krystalizację celulozy u *A. xylinum* badano w obecności związków chemicznych, zakłócających te procesy. Należą do nich: Calcofluor (kwas 4,4'-bis(4-anilino-6-bis(2-hydroksyetylo)amino-s-triazyno(-2-ylamino-2'-stilbeno)-disulfonowy), czerwień Kongo i karboksymetyloceluloza. Związki te łączą się podczas syntezy celulozy z łańcuchami glukawanowymi, uniemożliwiając tworzenie wiązań wodorowych (38). Przy wyższym od 0,01% stężeniu Calcofluoru w podłożu hodowlanym proces krystalizacji celulozy ulega przerwaniu i bakterie *A. xylinum* syntetyzują polisacharyd w postaci szerokich pasm, złożonych z pojedynczych mikrofibryli o grubości 1,5 nm (38). W badaniach krystalograficznych tak uformowanego produktu, a także jego zwiększonej podatności na hydrolizę enzymatyczną potwierdzono, że w obecności Calcofluoru syntetyzowana jest celuloza II o niskiej krystaliczności. Konwersję tej formy celulozy do postaci wysokokrystalicznej można osiągnąć poprzez jej



Fot. 1. Obraz mikroskopowy splecionych wstążek celulozowych (36).



Fot. 2. Obraz błony uformowanej na powierzchni pożywki (36).

wysuszenie. Następuje wówczas usunięcie Calcofluoru i łączenie się wiązaniami wodorowymi równoległych łańcuchów β -glukanowych w sieć krystaliczną. Calcofluor można również wycić buforem, co prowadzi do wznowienia syntezy wysokokrystalicznej celulozy o zasocjowanych wiązaniach wodorowymi łańcuchach. Natywna celuloza *A. xylinum* różni się od produktu syntetyzowanego w obecności Calcofluoru tym, że zachowuje krystaliczność celulozy I zarówno w formie wilgotnej, jak i wysuszonej.

W badaniach prowadzonych z Calcofluorem potwierdzono, że krystalizacja celulozy następuje po wyjściu z kanałów w ścianie komórkowej równoległe ułożonych łańcuchów β -glukanowych, w pobliżu tych kanałów. Polimeryzacja i krystalizacja są zatem procesami sekwencyjnymi i ściśle połączonymi.

6. Produkcja i możliwości wykorzystania celulozy bakteryjnej

Równoległe z badaniami na poziomie komórki prowadzone są intensywne prace nad technologią wytwarzania celulozy bakteryjnej i poznaniem jej walorów użytkowych. Produkcja tego polisacharydu na skalę przemysłową jest jeszcze niewielka, głównie ze względu na trudności związane z wyselekcjonowaniem właściwego szczepu — producenta tego polimeru i koszty składników podłoża. Najbardziej istotnym czynnikiem decydującym o opłacalności produkcji celulozy jest aktywność szczepu i jego zdolność do biosyntezy w warunkach hodowli wgłębnej. Na ogół szczepy takie otrzymywane są za pomocą metod mutagenizacji lub manipulacji genetycznych.

W hodowlach statycznych, w zależności od składu podłoża hodowlanego i aktywności szczepu, można uzyskać zwykle od 0,1 g do 0,5 g suchej celulozy ze 100 ml podłoża. Salter i Fiedler w takiej hodowli *A. xylinum*, prowadzonej w optymalnych warunkach otrzymywali nawet 0,7 g masy celulozowej ze 100 ml podłoża (40). Ci sami autorzy otrzymywali też celulozę, prowadząc hodowlę szczepu w fermentorze. Polisacharyd nagromadzał się na obracającym się wałku szklanym do połowy zanurzonym w pożywce. Po dziesięciu dobach hodowli uzyskiwano 5 mm warstwę masy celulozowej, z wydajnością do 24% w stosunku do wykorzystanej glukozy (41). Masaoka i współ. (42) wyselekcjonowali szczep *A. xylinum*, który w hodowli statycznej, w optymalnych warunkach, produkował celulozę w ilości 36 g w przeliczeniu na 1 dobę i na 1 m² powierzchni pożywki, z wydajnością 100% w stosunku do wykorzystanego źródła węgla.

Celuloza bakteryjna o nazwie handlowej Cellulon^R jest produkowana przez ulepszony szczep *Acetobacter xylinum*, będący wynikiem wieloletniego programu badawczego Weyerhaeuser Company (Tacoma, Washington) i Cetus Corp. (Emerville, California). Szczep ten wykazuje zdolność syntetyzowania celulozy w hodowli wgłębnej w fermentorze, z wydajnością 0,1 g x godz.⁻¹, co warunkuje opłacalność produkcji (22). Ben Bassat i współ. (14) donoszą o produkcji wysokokrystalicznej celulozy stosując metodę hodowli w fermentorze ulepszanego szczepu *A. xylinum*, który w wyniku mutacji utracił aktywność dehy-

drogenazy alkoholowej. Szczep ten w czasie 70 godzin hodowli syntetyzował celulozę z wydajnością $0,26 \text{ g} \times \text{godz.}^{-1}$

Dobry szczep produkcyjny powinien być stabilny genetycznie i charakteryzować się obniżoną zdolnością utleniania glukozy do kwasów organicznych (43,44).

Głównym celem badań nad technologią produkcji bakteryjnej celulozy jest ustalenie warunków, w jakich bakterie syntetyzowałyby celulozę o pożądanych cechach i z wysoką wydajnością, a także sposobu otrzymywania końcowego produktu. Najbardziej istotnymi czynnikami procesu biosyntezy są — temperatura, zwykle w granicach $26-31^{\circ}\text{C}$, kwasowość środowiska wyrażona wartością pH w zakresie $4,5 - 6,8$, skład pożywki i natlenienie.

A. Kai (45) badał szczegółowo wpływ temperatury i pH na biosyntezę włókienek celulozowych w hodowli szczepu *A. xylinum*. Stwierdził, że temperatura w zakresie $10-28^{\circ}\text{C}$ nie wpływa na formowanie włókienek celulozowych. W niższych temperaturach, np. przy 5°C , włókienka celulozowe wykazują w pierwszych godzinach hodowli właściwości amorficzne.

Badając wpływ pH na szybkość syntezy celulozy stwierdzono, że zależność ta ma charakter liniowy do momentu osiągnięcia maksimum przy pH 6,8, po czym, przy dalszym wzroście pH szybkość ta znacznie się obniża. Zaobserwowano ponadto, że temperatura i pH wpływają na długość włókienek celulozowych, a nie na ich szerokość (45).

Dotychczas ukazało się niewiele prac wyjaśniających wpływ natlenienia środowiska hodowlanego na proces biosyntezy bakteryjnej celulozy. Hestrin i Schramm (37), badając warunki polimeryzacji glukozy z udziałem liofilizowanych komórek *A. xylinum* wykazali, że wydajność procesu osiąga wartość maksymalną przy nasyceniu podłoża tlenem do ok. 100% i połowę tej wartości przy nasyceniu 20%. Według innych autorów wysoki poziom rozpuszczonego tlenu w podłożu fermentacyjnym może wpływać na obniżenie wydajności syntetyzowanej celulozy, w wyniku spontanicznego ujawniania się mutantów Cel^{-} , niezdolnych do jej biosyntezy (9). Zwraca się również uwagę na możliwość uszkodzenia błony, uformowanej w fermentorze z masy celulozowej, przy intensywnym napowietrzaniu pożywki (46).

Joris i współ. (47) próbowali wyjaśnić ujemny wpływ zwiększonego natlenienia podłoża na wydajność biosyntezy celulozy przez *A. xylinum*. Stwierdzili oni, że w hodowli wgłębnej, przy obrotach mieszadła 300 rpm można uzyskać tylko 50% masy celulozowej otrzymywanej w hodowli stacjonarnej. Autorzy zaproponowali sposób zwiększenia wydajności celulozy, nawet przy intensywnym napowietrzaniu, polegający na dodaniu do podłoża rozdrobnionego, obojętnego materiału (jak np. kuleczek szklanych). Adhezja komórek bakterii do tego materiału-nośnika jest istotna dla inicjacji procesu biosyntezy. Ponadto w wyniku agregacji cząstek nośnika tworzą się mikronisze pozbawione tlenu i w rezultacie zmniejsza się stopień konwersji glukozy do kwasu glukonowego, a zwiększa się ilość glukozy, która może być polimeryzowana do celulozy. Proces biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wgłębnej powinien przebiegać zatem przy obniżonym, lecz kontrolowanym poziomie rozpuszczonego tlenu w podłożu fermentacyjnym, najkorzystniej 0,5 ppm (46).

Niezwykle ważnym czynnikiem rzutującym w dużym stopniu na opłacalność produkcji celulozy bakteryjnej jest skład podłoża hodowlanego. Najczęściej stosowanym źródłem węgla jest glukoza, ale mogą być również wykorzystane fruktoza, sacharoza lub skrobia, w ilościach 25-100 g/l (46). W obecności galaktozy i ksylozy obserwowano słaby wzrost bakterii *A. xylinum* i niską wydajność celulozy (20).

Schmänder i współ. (48) badali wpływ glukozy i celobiozy oraz ich pochodnych na formę syntetyzowanej masy celulozowej. Uzyskiwali w zależności od rodzaju stosowanego substratu produkt w postaci błony lub żelu. Obok węglowodanów mogą być również dodawane do podłoża inne źródła węgla: kwas octowy, etanol i kwas cytrynowy (37,49).

Istotnym składnikiem podłoża limitującym wzrost szczepu *A. xylinum* i biosyntezę celulozy jest źródło azotu. Najczęściej są stosowane ekstrakty drożdżowe, peptony, ekstrakty kukurydziane, a także sole amonowe (50,51,52). W celu obniżenia kosztów podłoża hodowlanego próbuje się również wykorzystywać odpady pochodzenia roślinnego (46).

Najczęściej stosowanym do produkcji celulozy *A. xylinum* podłożem hodowlanym jest podłoże opracowane przez Schramma (37). Składa się ono (w % w/v) z ekstraktu drożdżowego Difco — 0,5, bactopectonu — 0,5, glukozy — 2,0, Na_2HPO_4 — 0,27 i kwasu cytrynowego — 0,115; pH podłoża wynosi 6,0.

Czystą celulozę z produktu otrzymanego po hodowli bakterii można łatwo wydzielić stosując macerację błony lub żelu rozcieńczonym roztworem wodorotlenku sodowego. Najczęściej używa się 1-2% roztworów NaOH i gotuje masę celulozową w czasie 1-2 godzin (16,53). Po dokładnym przemyciu i wyciśnięciu wody, błonę suszy się w temperaturze 60-100°C na szklanych płytach lub elastycznych podporach, w celu uniknięcia marszczenia (14,54). Tak oczyszczona błona, po odpowiednim ukierunkowanym sprasowaniu, charakteryzuje się zwiększoną wytrzymałością, o czym świadczy wysoki wskaźnik modułu Jounga, osiągający 30 GPa (16,19). Wysuszona błonka celulozowa charakteryzuje się znaczną porowatością (50-93% porów o średnicy 3000 nm) (14,17) i wybiórczą przepuszczalnością dla cieczy i gazów, co może być wykorzystane w procesie ich oczyszczania (55). Struktura niezwykle cienkich włókienek splecionych ze sobą decyduje o bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni — 200-krotnie przewyższającej powierzchnię pulpy drzewnej (39).

Wprowadzając do masy celulozowej dodatkowe komponenty, takie jak: emulsje, pudry, substancje dyspersyjne, różne związki wysokocząsteczkowe, można zwiększyć wodoodporność, odporność na chemikalia i poprawić szereg innych właściwości polimeru. Wprowadzenie niektórych metali (glinu, miedzi, żelaza, cynku i innych) podnosi elektrokonduktywność oraz przewodność termiczną celulozy. Inne dodatki, takie jak: tlenek tytanu, tlenek żelaza, węglan wapnia, mogą zwiększyć wytrzymałość na temperaturę i właściwości izolacyjne produktu (14).

Mikrofibryle celulozy bakteryjnej wykazują znaczną smukłość, wyrażoną stosunkiem długości do średnicy, który wynosi od 200 do 500. Szerokość mikrofibryli celulozy bakteryjnej (rzędu 40-60 nm) jest znacznie niższa od

szerokości mikrowłókien syntetycznych, organicznych i nieorganicznych, stosowanych do wyrobu materiałów filtracyjnych. Charakteryzują się one średnicami w zakresie 300-1000 nm (56). Ponieważ średnica włókienek decyduje o wielkości porów materiału filtracyjnego z niego wytworzonego, zastosowanie bakteryjnej celulozy do wyrobu tego materiału znacznie poprawia skuteczność filtracji. Tak wytworzone materiały filtracyjne znalazły już zastosowanie w mikro- i ultrafiltracji (57,58).

Celuloza bakteryjna charakteryzuje się niezwykle wysoką zdolnością do wiązania wody i do tworzenia wiązań z włóknami celulozowymi innego pochodzenia. Wykorzystuje się te właściwości przy wyrobie papieru (20). Dodatek bakteryjnej celulozy umożliwia otrzymanie jednorodnej struktury papieru o większej wytrzymałości.

Elastyczność i wytrzymałość dynamiczna bakteryjnej celulozy sprawiają, że dodanie jej do włókien niecelulozowych, czy mas plastycznych, umożliwia otrzymanie komponentów o znacznie ulepszonych cechach (53,14).

Istotną właściwością bakteryjnej celulozy jest to, że nie wywołuje ona alergii i może być stosowana jako materiał opatrunkowy, wykazuje bowiem wysokie właściwości wiązania osocza z uszkodzonej tkanki i może być poddawana sterylizacji. Z powodu podobieństwa do naturalnej skóry człowieka, celuloza bakteryjna, znalazła też zastosowanie jako zamiennik skóry, przy leczeniu rozległych oparzeń i przy przeszczepach skóry (21,53,59).

Dobrze rozwinięta powierzchnia, duża trwałość i wysokie zdolności adsorpcyjne bakteryjnej celulozy sprawiają, że jest ona wykorzystywana jako nośnik w immobilizacji drobnoustrojów i enzymów (48,54).

Polisacharyd ten może być stosowany w formie kartonów jako doskonały surowiec do sporządzania stożkowych membran głośnikowych, odznaczających się wysokim modułem sprężystości i znaczną wytrzymałością na rozrywanie (60). Właściwości bakteryjnej celulozy mogą być modyfikowane podczas biosyntezy, co poprzez kontrolę procesów polimeryzacji i krystalizacji daje możliwość uzyskania nowych jej odmian (18). Mikrofibryle celulozy mogą też w warunkach hodowli łączyć się z innymi polimerami; pozwala to uzyskać syntetyczno-naturalne produkty o nowych, interesujących właściwościach (61).

Rosnące zainteresowanie praktycznym wykorzystaniem celulozy i postęp w dziedzinie jej biosyntezy sprawiły, że produkcja i przetwórstwo celulozy stało się jedną z gałęzi przemysłu, opartą na syntezie biologicznej.

Literatura

1. Lenz R. W., (1993), *Advances in Polymer Science*, 107, 1-39.
2. Slodki M. E., Cadmus M. C., (1978), *Advances in Appl. Microb.*, Ed. Perlman D., 23, Academic Press, New York, San Francisco, London, 19-49.
3. Paul F., Morin A., Monsan P., (1986), *Biotechnol. Adv.*, 4, 245-249.
4. Hestrin S., (1963), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ed. Whistler R. L., New York, London, 3, 4-9.
5. Hestrin S., (1962), *The Bacteria*, Eds. Gunsalus I. C., Stanier R. Y., New York, London, 3, 373-386.
6. Smith I. H., Pace G. W., (1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, 119-129.

7. Ross P., Mayer R., Bensiman M., (1991), *Microbiological Reviews*, 55, 35-54.
8. Glaser L., (1958), *J. Biol. Chem.*, 232, 627-636.
9. Schramm M., Hestrin S., (1954), *J. Gen. Microb.*, 11, 123-129.
10. Colvin J. R., (1980), *Plant Biochemistry*, Ed. Priess J., Academic Press, Inc., New York, 3, 543-570.
11. Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G. A., van Boom J. H., Benziman M., (1987), *Nature*, 325, 279-281.
12. Takai M., Watanabe S., (1975), *Polymer Journal*, 7, 147-156.
13. Benziman M., Eisen N., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 57-62.
14. Patent, (1987), EP, Nr 86 308092,5.
15. Okijama A., Motoki M., Yamanaka S., (1992), *Food Hydrocolloids*, 6, 479-487.
16. Yamanka S., Watanabe K., Kitamura N., Iguchi M., Mitsushashi S., Nishi Y., Uryu M., (1989), *Journal of Materials Science*, 24, 3141-3145.
17. Patent, (1989), JP, Nr JP1193335.
18. Patent, (1990), USA, Nr 22904.
19. Komachiya Y., (1990), *Sci. and Technol. Jap.*, 9, 33, 38-41.
20. Romano M., Franzosi G., Seves A., Sora S., (1989), *Cellul. Chem. Technol.*, 23, 3, 217-221.
21. Fontana J. D., de Souza A., Fontana C. K., Torriani J. L., (1990), *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 24-25, 253-264.
22. Kent R. A., Stephens R. S., Westland J. A., (1991), *Food Technology*, 5, 108.
23. Weinhouse H., Benziman M., (1971), *Eur. J. Biochem.*, 38, 83-88.
24. Benziman M., Paldi A., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 1603-1610.
25. Gromet Z., Schramm M., Hestrin S., (1957), *Biochem. J.*, 67, 679-689.
26. Benziman M., Russo A., Hochman S., Weinhouse H., (1978), *J. Bacteriol.*, 134, 1-9.
27. Benziman M., (1969), *J. Bacteriol.*, 98, 1005-1010.
28. Swissa M., Aloni Y., Weinhouse H., Benziman M., (1980), *J. Bacteriol.*, 143, 1142-1150.
29. Benziman M., Rivetz B., (1972), *J. Bacteriol.*, 111, 325-333.
30. Aloni Y., Cohen Y., Benziman M., Delmer D. P., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 4419-4423.
31. Valla S., Coucheron D. H., Fjaervik E., Kjasbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 217, 26-30.
32. Lin F. C., Brown R. M., Jr., Cooper J. B., Delmer D. P., (1985), *Science*, 230, 822-825.
33. Burean T. E., Brown R. M., Jr., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 6985-6989.
34. Zaar K., (1979), *J. Cell. Biol.*, 80, 773-777.
35. Haighler C. H., (1985), *Cellulose chemistry and its applications*, Eds. Nevell R. R., Zeronian S. H., Ellis Horwood Ltd., Chichester, Anglia, 151-208.
36. Galas E., Krystynowicz A., praca nie opublikowana.
37. Hestrin S., Schramm M., (1954), *Biochem. J.*, 58, 345-352.
38. Haighler C. H., Brown R. M., Jr., Benziman M., (1980), *Science*, 210, 903-906.
39. Kai A., (1990), *Sci. and Ind.*, 64, 10, 491-499.
40. Fiedler S., Füssel M., Sattler K., (1989), *Zentralbl. Mikrobiol.*, 144, 473-484.
41. Sattler K., Fiedler S., (1990), *Zentrale. Mikrobiol.*, 145, 247-252.
42. Masaoka S., Ohe T., Sakota N., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 1, 28-23.
43. Masaoka S., Ohe T., Sakota N., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 1, 18-22.
44. Ben-Bassat A., Bruner R., Wong H., Shoemaker S., Aloni Y., (1989), *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 198, Meet., MBTD20.
45. Kai A., (1984), *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 57, 10, 2816-2819.
46. Patent (1988), WO8809381.
47. Joris K., Wulf P., Vandane E. J., (1993), *Sixth European Congress on Biotechnology, Firenze, Abstr. V. 3 WE 148.*

48. Schmander H. P., Einfledt L., Geyer U., Klemm D., (1992), Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksunio. Gent., 57, 4a, 1797-1799.
49. Bar R., Gainer J. L., Kirwan D. J., (1986), Biotechnol. Bioenerg., 28, 8, 1166-1171.
50. Patent, (1986), EP, Nr EP-186495.
51. Patent, (1987), US, Nr US 4655758.
52. Patent, (1993), JP, Nr JP 5115291.
53. Patent, (1988), EP, Nr EP-28993.
54. Patent, (1988), JP, Nr J63294794.
55. Patent, (1991), EP, Nr EP-416470.
56. Pein J., (1990), Glasfaserpapiere, Filtrieren und Separieren, 4, 163-165.
57. Patent, (1988), JP, Nr J63205109.
58. Kai A., (1990), Sci. and Ind., 64, 491-494.
59. Patent, (1986), WO, Nr WO8602095.
60. Patent, (1988), JP., Nr J63199201.
61. Patent, (1989), Univ. Texas-Syst. Nr EP-346507.

Praca finansowana przez KBN w ramach grantu Nr 7 S204 004 07.

Biosynthesis of bacterial cellulose and its application

Summary

Biosynthesis of bacterial cellulose and its potential applications are presented. The mechanism of cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*, the regulatory pathways and the polymer structure are described. Some biotechnological aspects of polysaccharide production and industrially valuable features of bacterial cellulose are also discussed.

Key words:

bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, biosynthesis, regulation, biogenesis, microfibril, exopolysaccharides.

Adres dla korespondencji:

Alina Krystynowicz, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.