

CELULOZA BAKTERYJNA JAKO NANOBIMATERIAŁ

BACTERIAL CELLULOSE AS A NANOBIMATERIAL

Katarzyna KUBIAK, Halina KALINOWSKA, Marta PEPLIŃSKA,
Stanisław BIELECKI

Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Politechnika Łódzka, Łódź

Streszczenie: Celuloza bakteryjna jest nanobimateriałem o interesujących właściwościach, decydujących o jej szerokim zastosowaniu w medycynie i licznych dziedzinach techniki. Ten wytwarzany biotechnologicznie materiał charakteryzuje się m.in. ogromną higroskopijnością, wysoką czystością chemiczną, unikalną strukturą oraz pełną biokompatybilnością, biofunkcjonalnością i brakiem toksyczności. Jednak molekularne podstawy biosyntezy celulozy przez *Gluconacetobacter xylinus* nie są do końca poznane. Znane dotychczas sekwencje i funkcje genów i białek bezpośrednio zaangażowanych w szlak metaboliczny, prowadzący do syntezy β -1,4-glukanu nie są wystarczające do zrozumienia sieci zależności i regulacji, decydujących o intensywności tego procesu oraz właściwościach wydzielanej celulozy. Prawdopodobnym wydaje się zaangażowanie w te mechanizmy globalnych regulatorów ekspresji genów, znanych z opisanych wcześniej mechanizmów kontrolujących tworzenie biofilmów przez organizmy modelowe. Ze względu na swój potencjał aplikacyjny zarówno w formie natywnej, jak i zmodyfikowanej, wykraczający poza zewnętrzne i wewnętrzne zastosowania w medycynie, celuloza bakteryjna to materiał przyszłości, a odkrycia w obszarze molekularnych systemów kontroli jej biosyntezy mogą doprowadzić do znacznego zwiększenia jej produkcji na skalę przemysłową.

Słowa kluczowe: nanomateriały, celuloza bakteryjna, biosynteza celulozy, c-di-GMP, regulacja ekspresji genów, CsrA/BC, sRNA.

Summary: Bacterial cellulose is a nanobimaterial with many interesting characteristics, deciding of its numerous applications in medicine and other areas. This material is biotechnologically obtained and shows several important features: is extremely hygroscopic, chemically pure, uniquely structured, biocompatible, biofunctional and non-toxic. However, its biosynthesis by *Gluconacetobacter xylinus* has not been completely elucidated at the molecular level. The knowledge on sequences and functions of known genes and proteins that are directly involved in the metabolic pathway producing the β -1,4-glucan is insufficient to understand the overall network of the interplay and regulation influencing the intensity of bacterial cellulose synthesis and its properties. It is possible that this mechanism involves some global gene expression regulators which are known from described earlier mechanisms controlling formation of biofilms by model organisms. Due to its applicable potential both in native and modified form, exceeding its external and internal uses in medicine, bacterial cellulose is a material of future. Expected discoveries in a field of molecular control systems of BC biosynthesis can give rise to its much larger production in industrial scale.

Keywords: nanomaterials, bacterial cellulose, cellulose biosynthesis, c-di-GMP, gene expression regulation, CsrA/BC, sRNA.

WSTĘP

Nanomateriały, zawdzięczające swą nazwę wymiarom, z których co najmniej jeden mieści się w przedziale od 1 do 100 nm i z tego względu mające stosunkowo dużą powierzchnię właściwą (stosunek powierzchni do masy), charakteryzują się wysoką reaktywnością chemiczną [47]. Jest ona spowodowana silniejszymi, w porównaniu z tradycyjnymi materiałami, oddziaływaniami pomiędzy atomami wchodzącymi w skład nanomateriałów a otoczeniem. Wpływ efektów kwantowych nadaje im unikalne właściwości optyczne, magnetyczne i elektryczne. Dzięki tym cechom nanomateriały znajdują coraz to nowe zastosowania praktyczne, przede wszystkim w elektronice, medycynie, chemii i produkcji materiałów kompozytowych. Na przykład ich dodatek do wyrobów hutniczych i tworzyw sztucznych podnosi odporność chemiczną i wytrzymałość mechaniczną, zaś użycie do produkcji materiałów medycznych pozwoliło zwiększyć skuteczność terapii przeciwnowotworowych i przyspieszyć gojenie ran.

Jak dotąd, większość nanomateriałów otrzymuje się przy zastosowaniu metod chemicznych, fizycznych i fizykochemicznych. Wymagają one stosowania wyspecjalizowanej aparatury i sterylnej czystości linii technologicznych. Ich przykładami są np. synteza chemiczna dendrymerów i innych polimerów, fotolitografia, nakładanie monowarstw atomów, techniki laserowe itp. Interesującą alternatywą dla wyrafinowanych i kosztownych nanotechnologii jest produkcja nanomateriałów metodami biotechnologicznymi z wykorzystaniem żywych organizmów bądź preparatów enzymatycznych. W ten sposób najczęściej otrzymywane są niektóre nanobiomateriały, takie jak np. polisacharydy i materiały kompozytowe, powstałe w wyniku ich modyfikacji. Do tej grupy należy celuloza bakteryjna i jej pochodne.

NANOBIOBIMATERIAŁY: WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIA

Stosunkowo duża grupa nanomateriałów jest stosowana w medycynie, co pociąga za sobą kontakt z żywymi komórkami oraz tkankami. Z tego względu muszą one spełniać szereg wymogów: efektem ich wprowadzenia do organizmu nie może być nowotworzenie, muszą być biokompatybilne (nie wykazywać cytotoksyczności) oraz biofunkcjonalne (być zdolne do biologicznych, biofizycznych i biochemicznych oddziaływań z żywym organizmem) i hipoalergiczne oraz nie mogą wywoływać reakcji zapalnej ani w inny sposób stymulować systemu immunologicznego organizmu [35]. W zależności od zastosowania biomateriały albo muszą wykazywać wysoką adhezję do białek (jeżeli są np. nośnikami cząsteczek aktywnych), albo wprost przeciwnie, powinny zapobiegać ich wiązaniu (jeżeli np. stymulowałyby niepożądaną adhezję komórek lub rozwój mikrobiologicznego biofilmu) [2]. Wyznacznikiem tej cechy jest tzw. krytyczne napięcie powierzchniowe – CST (ang. *Critical Surface Tensions*), które w tym drugim przypadku powinno mieścić się w zakresie 20–30 mN/m.

Do nanobiomateriałów stosowanych w medycynie należą: nanomuszelki (ang. *nanoshells*), nanorurki węglowe, dendrymery, kwantowe kropki (ang. *quantum dots*), superparamagnetyczne nanocząsteczki, liposomy [23], nanocząsteczki o charakterze przeciwutleniaczy (np. tlenek trójwartościowego ceru) [21], a także niektóre biomolekuły, np. polipeptydy o charakterze kopolimerów [8] i polisacharydy [4], otrzymywane metodami biotechnologicznymi.

Stosowane są one w następujących zastosowaniach:

a) do ukierunkowanego i kontrolowanego transportu leków do określonych narządów czy tkanek, gdyż dzięki możliwości przenikania przez błony komórkowe stanowią tzw. inteligentne nośniki enzymów, receptorów i innych białek oraz związków chemicznych, o charakterze leczniczym;

b) jako opatrunki do leczenia ran, zwłaszcza przewlekłych, o różnej etiologii, zapewniające przyspieszenie procesu gojenia, regenerację tkanek i ochronę przed wtórnymi infekcjami;

c) jako doskonalsze, nowe materiały do produkcji: sztucznych organów hybrydowych, implantów, powłok, przeciwdziałających rozwojowi biofilmów wytwarzanych przez mikroorganizmy chorobotwórcze; a także narzędzi tnących [28].

Przykładem pierwszego z wymienionych zastosowań są próby wykorzystania wspomnianych wyżej nanomuszelek w nowej odmianie terapii fotodynamicznej. Nanocząsteczki te są zbudowane z krzemowego centrum, otoczonego cieniutką warstwą atomów złota, które absorbują i rozpraszają fale świetlne z zakresu bliskiej podczerwieni, wydzielając przy tym ciepło. Przyłączone są do nich, za pośrednictwem glikolu polietylenowego, przeciwciała specyficzne wobec białek znajdujących się na powierzchni komórek rakowych. Dzięki nim wprowadzone do krwiobiegu nanomuszelki wybiórczo wiążą się z markerami powierzchniowymi komórek nowotworowych, zaś naświetlone falami o odpowiedniej długości (np. 800 nm) silnie się nagrzewają, co prowadzi do zniszczenia tychże komórek.

Jako specyficzne nośniki cząsteczek kwasów nukleinowych i innych związków terapeutycznych do wnętrza komórek testowane są także nanorurki węglowe, czy dendrymery. Te drugie są kulistymi polimerami o rozgałęzionym jądrze, zbudowanym np. z reszt kwasu akrylowego i etylenodiaminy, do którego dołączone są kolejne warstwy rozgałęzionych związków, np. cukrów prostych. Uzyskana w ten sposób duża ilość grup aktywnych na powierzchni dendrymeru pozwala przyłączyć np. barwniki fluorescencyjne, związki rozpoznawane przez określone receptory, leki i tym podobne substancje, co czyni dendrymery przydatnymi zarówno w diagnostyce, jak i w terapii (np. przeciwnowotworowej).

Innymi nanocząsteczkami przydatnymi w diagnostyce są tzw. nanokropki kwantowe, czyli zbudowane z półprzewodników (np. selenku kadmu pokrytego siarczkiem cynku, razem 10–50 atomów) nanokryształy o średnicy od 2 do 10 nm, związane z np. specyficznymi białkami lub kwasami nukleinowymi. Ponieważ wykazują fluorescencję wzbudzaną falami UV, można obserwować np. ich lokalizację wewnątrz organizmu, tkanki czy komórki. Jeśli są przyłączone do specyficznych przeciwciał, rozpoznających komórki rakowe, mogą ułatwiać wykrycie guzów. W podobnym celu wykorzystuje się superparamagnetyczne nanocząsteczki o średnicy poniżej 10 nm,

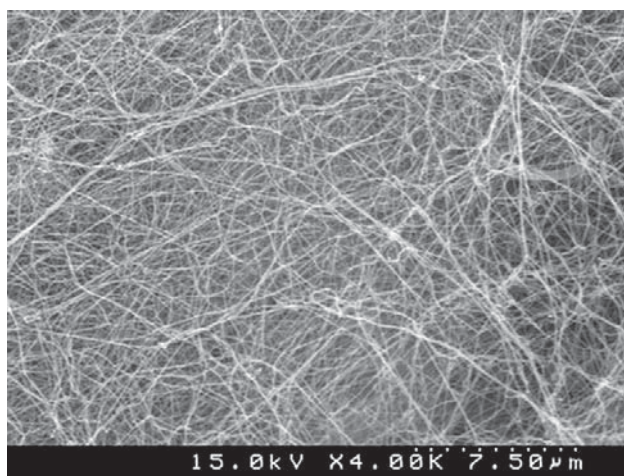
zbudowane z tlenków żelaza, w tym magnetytu Fe_3O_4 , które są doskonałym środkiem kontrastowym podczas badań z zastosowaniem rezonansu magnetycznego.

Również liposomy stanowią nośnik do transportu substancji leczniczych do wnętrza komórek, gdyż właściwości ich otoczki umożliwiają fuzję z błoną komórkową. Nie są one nanomateriałami *sensu stricte*, gdyż średnica tych otoczonych dwuwarstwą lipidową pęcherzyków waha się od 90 do 150 nm, ale umownie zalicza się je do tych substancji.

Do nanomateriałów stosowanych jako materiały opatrunkowe oraz składnik implantów należy celuloza bakteryjna. Jest ona jednym z wielu polisacharydów syntetyzowanych przez drobnoustroje. Polimery te są generalnie rzecz biorąc doskonałym przykładem gotowych do użycia nanobiomateriałów, odznaczających się wysoką czystością chemiczną i bardzo uporządkowaną budową. Zaletą większości polisacharydów mikrobiologicznych jest regularna, liniowa lub rozgałęziona struktura, zapewniająca przyjmowanie przez łańcuch uporządkowanej konformacji nawet w rozcieńczonych roztworach wodnych i/lub tworzenie stabilnych żeli lub liotropowych ciekłych kryształów [11]. Ich właściwości można jeszcze udoskonalić za pomocą manipulacji genetycznych szczepu producenta, przez zastosowanie odpowiednich warunków podczas hodowli drobnoustroju albo stosując modyfikacje chemiczne i/lub enzymatyczne po zakończeniu procesu hodowlanego.

WŁAŚCIWOŚCI CELULOZY BAKTERYJNEJ

Celuloza bakteryjna jest nanomateriałem, gdyż łańcuchy liniowego β -1,4-glukanu o stopniu polimeryzacji zbliżonym do 15000 tworzą nanofibryle o przekroju poprzecznym 5–10 nm \times 30–35 nm [4]. Te z kolei tworzą wstęgi o szerokości 70–150 nm (ryc. 1). Polisacharyd wytwarzany przez bakterie ma szereg zalet w porównaniu z celulozą roślinną. Charakteryzuje się mniejszym przekrojem



RYCINA 1. Ułożenie przestrzenne nanowłókien celulozy bakteryjnej tworzących membranę [4]
FIGURE 1. Arrangement of nanofibers building up a bacterial cellulose membrane [4]

poprzecznym włókien, wysokim stopniem krystaliczności (ponad 60%) i brakiem zanieczyszczeń, takich jak hemicelulozy czy lignina.

Najwydajniejszymi producentami celulozy bakteryjnej są szczepy gram-ujemnych, tlenowych bakterii *Gluconacetobacter xylinus* (wcześniej klasyfikowanych jako *Acetobacter xylinum*). W warunkach laboratoryjnych, aby utrzymać się na powierzchni ciekłych pożywek, gdzie nie grozi im brak tlenu, syntetyzują one białą, skóropodobną, silnie uwodnioną, elastyczną i związaną z komórkami membranę. *Ga. xylinus* należy do drobnoustrojów barotolerancyjnych i syntetyzuje BC nawet pod ciśnieniem do 100 MPa, choć ze wzrostem ciśnienia obniża się wydajność tego procesu [20]. Membrany wytwarzane przez szczepy *Ga. xylinus* i innych bakterii różnią się elastycznością, zdolnością wiązania wody, stopniem polimeryzacji (zwykle 2000–6000, ale w niektórych przypadkach nawet 16000 lub 20000) i stopniem krystaliczności. Właściwości te zależą także od warunków hodowli (stacjonarna lub wstrząsana), czasu jej trwania i składu podłoża (źródła C i N, obecności innych polimerów, np. kolagenu, hemiceluloz) oraz od metody oczyszczania BC z komórek bakterii i resztek podłoża, a także sposobu ewentualnej modyfikacji po zakończeniu hodowli. Droga modyfikacji fizyko-chemicznych celulozy bakteryjnej otrzymano inne ciekawe nanomateriały, do których należą nanoprzewodniki zbudowane z nanokrystalłów TiO_2 [55] lub ZnO [5], związanych z matrycą celulozową.

Wiele badań nad *Ga. xylinus* jako wydajnym producentem celulozy było poświęconych przede wszystkim optymalizacji składu podłoży hodowlanych i warunków prowadzenia hodowli. Ogromną zaletą szczepów *Ga. xylinus* jest ich dobry wzrost na różnorodnych źródłach węgla i azotu. Celem obniżenia kosztów produkcji BC bakterie bywają hodowane na pożywkach zawierających substancje odpadowe, takie jak np. glicerol, melasa, serwatka, odpady przetwórstwa warzyw itp. [1, 26, 45]. Zauważono również, że szczepy *Ga. xylinus* wydajnie produkują błonę celulozową na podłożach stałych lub o charakterze żelu [13]. Z kolei szerokość wstęg BC udało się zwiększyć przez dodatek do pożywki chloramfenikolu, który powodował wydłużenie komórek *Ga. xylinus*, a tym samym wpłynął na wzajemne położenie por, przez które wydzielane są poza komórkę łańcuchy β -1,4-glukanu [53]. Istotną obserwacją wydają się także doniesienia na temat intensyfikacji produkcji BC przez *Ga. xylinus* hodowanych w jednym podłożu z *Lactobacillus mali*. Co ciekawe, hodowla mieszana z innymi gatunkami bakterii kwasu mlekowego nie miała wpływu na produkcję BC [39]. Badania te mogą sugerować istnienie współzależności pomiędzy tymi dwoma gatunkami, mogącymi w naturze konkurować o środowisko życia, gdyż obydwa bytują na materiale roślinnym. Sugestia na temat wytwarzania błony celulozowej celem dominacji innych gatunków, zajmujących tę samą niszę ekologiczną, znalazła się także w bardzo wczesnej pracy Williamsa i Cannona [49]. Autorzy dowiedli ponadto, że błona celulozowa pełni funkcje ochronne przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi (np. promieniowanie UV, niska wilgotność). Cechy te sugerują, że błona celulozowa stanowi rodzaj biofilmu wytwarzanego przez *Ga. xylinus*.

MOLEKULARNE ASPEKTY BIOSYNTETY CELULOZY PRZEZ *Gluconacetobacter xylinus*

Pomimo długoletnich badań nad optymalizacją warunków hodowli *Ga. xylinus*, w tej chwili nie jest możliwa pełna kontrola procesu biosyntezy celulozy ani jej właściwości. Aby osiągnąć ten cel, konieczne są szerokie badania genetyczne, umożliwiające poznanie zależności molekularnych pomiędzy białkami zaangażowanymi bezpośrednio i pośrednio w wydzielanie tego polimeru. Istotnym utrudnieniem we wdrożeniu procesu biosyntezy celulozy do przemysłu jest ogromna różnorodność pomiędzy szczepami *Ga. xylinus* pod względem wymogów pokarmowych, jak i wydajności produkcji BC. Ponadto, w przypadku niektórych szczepów obserwuje się powstawanie komórek niewytwarzających celulozy (tzw. formy Cel⁻), szczególnie często podczas hodowli wglębnych. Dotychczas nie zostały wyjaśnione molekularne podstawy występowania tej zmienności fenotypowej *Ga. xylinus*. Jedną z dyskutowanych w literaturze przyczyn jest obecność elementu insercyjnego IS1031, jednak jego decydująca rola w powstawaniu form Cel⁻ nie została jednoznacznie udowodniona [10]. Szczepy *Ga. xylinus* zawierają zwykle system kilku plazmidów o różnej wielkości (od 16 do 300 kpz). Na ogół komórki Cel⁺ i Cel⁻ różnią się profilem plazmidowym, ale należy podkreślić, że znaleziono również szczepy syntetyzujące BC i niemające plazmidów [46].

Dotychczas materiał genetyczny *Ga. xylinus* nie został zsekwencjonowany, taki projekt trwa w NITE (*National Institute of Technology and Evaluation*) w Japonii (według informacji podanej na stronie <http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/project-e.html>). W bazach danych zamieszczono jak dotąd 90 sekwencji nukleotydowych i 160 sekwencji białek *Ga. xylinus*, w większości związanych bezpośrednio z biosyntezą celulozy. Organizacja operonu syntazy celulozowej jest znana od ponad dekady. Operon ten zawiera gen syntazy celulozy (podjednostki katalitycznej) *acsA* oraz gen białka wiążącego cząsteczkę cyklicznego diguanozyłomonofosforanu (c-di-GMP) – *acsB*, pełniącego funkcję aktywatora podjednostki A [24]. Ponadto, u części szczepów *Ga. xylinus* (m.in. ATCC 53582) zidentyfikowano również geny *acsC* i *acsD*, których produkty prawdopodobnie odgrywają rolę, odpowiednio, w formowaniu porów w zewnętrznej otoczce (podjednostka C) oraz w procesie krystalizacji celulozy (podjednostka D) [50]. Obecność obydwu genów jest niezbędna do biosyntezy celulozy *in vivo*, ale nie jest wymagana dla syntezy BC *in vitro* [37]. Ponadto proces *in vivo* wymaga współdziałania syntazy celulozowej i białek enzymatycznych, kodowanych przez pewne geny umiejscowione poniżej i powyżej jej operonu, takich jak: β -glukozydaza [43], β -1,4-glukanaza i białko CcpAX (ang. *Cellulose complementing Protein Acetobacter xylinum*). Ich dokładna rola w procesie biosyntezy BC nie została dotychczas wyjaśniona. Szlak metaboliczny prowadzący do powstania celulozy rozpoczyna się od przekształcenia glukozy w urydynodi-fosfoglukozę (UDP-glukozę), która jest donorem reszt β -D-glukopiranozy do reakcji polimeryzacji β -1,4-glukanu. W procesie tym bierze udział co najmniej 8 białek, w tym 4 kluczowe enzymy: glukokinaza, fosfoglukomutaza, urydyliltransferaza glukozo-1-fosforanowa i wspomniana wyżej syntaza celulozowa. Białka te oraz sekwencje kodujących je genów są dobrze poznane [4, 22], ale nic nie wiadomo na temat regulacji ich ekspresji.

Jedynym potwierdzonym mechanizmem regulacji procesu biosyntezy celulozy u *Ga. xylinus* jest wspomniana wyżej allosteryczna aktywacja podjednostki B syntazy celulozowej poprzez c-di-GMP [18, 37]. Za kontrolę poziomu tego związku w komórce odpowiadają enzymy o przeciwnych funkcjach: cyklazy diguanylowe (DGC, odpowiedzialne za jego syntezę z dwóch cząsteczek GTP z uwolnieniem dwóch cząsteczek pirofosforanu) i fosfodiesterazy A (PDE A, odpowiedzialne za jego degradację do nieaktywnego, liniowego pGpG, ulegającego dalszej hydrolizie do GMP, katalizowanej przez PDE B). Geny tych trzech enzymów tworzą wspólny operon (pomimo przeciwstawnych aktywności), występujący u *Ga. xylinus* w 3 różnych wariantach, których ekspresja dostarcza odpowiednio 80, 15 i 5% tych białek [44]. W budowie fosfodiesterazy A zidentyfikowano domenę sensoryczną, zawierającą hem, która powoduje obniżenie zdolności tego enzymu do hydrolizy c-di-GMP w warunkach dobrego natlenienia [7]. Stanowi to częściowe wyjaśnienie gorszej wydajności produkcji BC w hodowlach wglębnych. Właściwość ta nie jest jednak uniwersalna dla wszystkich szczepów *Ga. xylinus*.

Cyklazy diguanylowe i fosfodiesterazy zawierają charakterystyczne domeny GGDEF i EAL. Na podstawie ich obecności zaczęto klasyfikować podobne białka, znajdujące u innych mikroorganizmów. Wśród licznych funkcji, pełnionych przez białka z tych rodzin ich wspólną cechą jest udział w kontroli poziomu c-di-GMP w komórce. Obecnie c-di-GMP jest uważany za tzw. bakteryjny wtórny przekaźnik (ang. *secondary messenger*). Udowodniono jego regulacyjną rolę w wielu różnych procesach komórkowych poprzez m.in. uzależnianie ich tempa od sygnałów płynących ze środowiska [38]. Często kontrolowane z jego udziałem szlaki są zaangażowane w syntezę składników biofilmu (m.in. celulozy).

Najnowsze badania w komórkach *Escherichia coli* ujawniły nadrzędną rolę globalnego regulatora – CsrA (ang. *Carbon storage regulator A*) w kontroli ekspresji białek należących do rodzin GGDEF i EAL [19]. Białko to zostało odkryte kilkanaście lat temu u *E. coli*, jako odpowiedzialne za regulację ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów [52]. Obecnie znane są jego homologi u licznych gatunków bakterii i uważany jest za strażnika przejścia w fazę stacjonarną wzrostu. Ilość białka CsrA, pełniącego funkcję represora, jest kontrolowana przez regulatorowe RNA (CsrB i CsrC), zdolne do wiązania po kilkanaście jego cząsteczek. Powiązanie dwóch ważnych globalnych mechanizmów regulacyjnych, jakimi są system Csr i sygnalizacja c-di-GMP, jest bardzo ważnym odkryciem. Udowodniono, że CsrA kontroluje poziom ekspresji białek ycdT i ydeH, zawierających domenę GGDEF, odpowiedzialnych za regulację stężenia c-di-GMP w komórkach *E. coli* [19]. W ten sposób, pośrednio decyduje ono o zmianie planktonicznego trybu życia na osiadły. Ponadto CsrA bezpośrednio wpływa na ruchliwość bakterii i tworzenie przez nie biofilmu poprzez regulację ekspresji odpowiednio: *flhDC* (koduje białko uczestniczące w tworzeniu wici) i *pgaA* (koduje białko odpowiedzialne za syntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów) [19].

W literaturze nie ma żadnych informacji na temat szlaków regulacji ekspresji genów kodujących białka GGDEF/EAL czy enzymy zaangażowane bezpośrednio w biosyntezę celulozy u *Ga. xylinus*. Bez opisu takich procesów trudno myśleć o kontroli wydzielania

polimeru na poziomie molekularnym. Dotychczasowe próby modyfikacji genetycznej *Ga. xylinus* nie przyniosły spektakularnych sukcesów. Opisane w literaturze manipulacje dotyczyły ingerencji w szlaki metaboliczne węglowodanów. Pierwszym przykładem takich badań było wprowadzenie do *Ga. xylinus* BPR2001 zmienionego genu syntazy sacharozy z fasoli Mung. Enzym ten bardzo wydajnie katalizuje konwersję sacharozy do UDP-glukozy, jednocześnie zapewniając niskie stężenie wolnego UDP w komórce. Wprowadzenie go do *Ga. xylinus* wywołało dwu- a nawet trzykrotny wzrost wydajności syntezy celulozy [31]. Inną interesującą modyfikacją szczepu *Ga. xylinus* BPR2001 była atenuacja genu *aceA* kodującego β -glukozylotransferazę o postulowanej przez autorów roli w szlaku syntezy acetanu (polisacharydu rozpuszczalnego). Otrzymane mutanty nie były zdolne do produkcji acetanu, ale wytwarzały także mniej celulozy niż szczep rodzicielski. Produkcja celulozy na wyjściowym poziomie była indukowana przez dodatek acetanu do podłoża. Wyniki te doprowadziły autorów do wniosku, że w badanym szczepie szlaki metaboliczne prowadzące do wytwarzania celulozy i rozpuszczalnego acetanu są od siebie niezależne genetycznie [17]. Najnowszym i ostatnim przykładem udanego zwiększenia produktywności szczepu *Ga. xylinus* BPR2001 są badania nad mutantem pozbawionym genu kodującego dehydrogenazę glukozową, katalizującą utlenienie glukozy do kwasów glukonowego i keto-glukonowego. Reakcja ta może być traktowana jako konkurencyjna do polimeryzacji UDP-glukozy do β -1,4-glukanu. W efekcie tej zmiany poprawa produktywności szczepu nie była ewidentna – dotyczyła tylko hodowli prowadzonej w pożywce zawierającej glukozę jako źródło węgla (nie było zmian w przypadku stosowania fruktozy), a ilość powstającej celulozy zwiększyła się jedynie 1,7 raza [41].

Istotnym zagadnieniem w obszarze badań nad wydajnością produkcji celulozy przez *Ga. xylinus* jest wpływ dodatku etanolu na jego metabolizm. W literaturze są dyskutowane często sprzeczne doniesienia na temat efektu wywoływanego przez ten alkohol u różnych szczepów. Istnieją dwie hipotezy na temat mechanizmu, za którego pośrednictwem jest wywierany ten wpływ. Niektórzy badacze przychylają się do hipotezy, że etanol wpływa na szlaki przemian cukrów u *Ga. xylinus* blokując szlak fosfotransacetylazy [25]. Inni uważają, że etanol stymuluje wytwarzanie ATP, a tym samym prowadzi do aktywacji glukohexokinazy i zintensyfikowania szlaku prowadzącego do produkcji celulozy [41]. Niedyskutowanym dotąd w literaturze, a bardzo interesującym aspektem oddziaływania etanolu na komórki *Ga. xylinus* jest wywoływanie stresu komórkowego, jak to jest sugerowane np. u bakterii kwasu mlekowego [42] czy *Bacillus subtilis* [16]. Jak wspomniano wyżej, możliwe, że błona celulozowa jest formą biofilmu, zatem stymulacja jej wytwarzania przez czynniki wywołujące stres komórkowy wydaje się prawdopodobna.

Za regulację ekspresji genów w warunkach stresu wywołanego różnymi czynnikami (m.in. podwyższoną lub obniżoną temperaturą, zmianami ciśnienia osmotycznego, obecnością etanolu) odpowiadają regulatorowe podjednostki polimerazy RNA, tzw. alternatywne czynniki sigma, np.: σ^S , σ^E , σ^B . Ich aktywność bywa też uzależniona od mechanizmów uruchamianych przez sygnały ze środowiska – tzw. systemów dwuskładnikowych – TCS (ang. *Two Component Systems*). Specyficzna informacja jest odbierana przez wyspecjalizowane białko sensorowe i przenoszona do wnętrza komórki, a następnie przekształcana na odpowiedź komórki poprzez aktywację (np.

w drodze fosforylacji) regulatorów ekspresji genów. Regulatory te mogą być zarówno aktywatorami, jak i represorami, wiążącymi się ze specyficznymi sekwencjami znajdującymi się w obszarze poprzedzającym promotor regulowanego genu. Mechanizmy molekularne, odpowiedzialne za kontrolę takich złożonych procesów, jak reakcja na stres czy tworzenie biofilmów, często angażują ponadto regulatorowe cząsteczki RNA, nazywane małymi RNA – sRNA (ang. *small RNA*). Zastosowanie takich regulatorów jest bardzo korzystne dla komórek bakteryjnych m.in. ze względu na krótki czas potrzebny do zsyntetyzowania cząsteczki kwasu rybonukleinowego w porównaniu z czasem niezbędnym do utworzenia funkcjonalnej proteiny. Mechanizmy działania sRNA są bardzo różnorodne i mogą polegać zarówno na oddziaływaniu z komplementarnym (przynajmniej częściowo) odcinkiem mRNA (np. DsrA, regulujące ekspresję *rpoS*, kodującego σ^S [6]) lub na modulowaniu aktywności białkowych regulatorów translacji (np. wspomniany wcześniej system CsrA/BC [19]). W naszym zespole rozpoczęto badania mające na celu identyfikację globalnych systemów regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za kontrolę procesu biosyntezy celulozy u *Ga. xylinus*.

ZASTOSOWANIA CELULOZY BAKTERYJNEJ

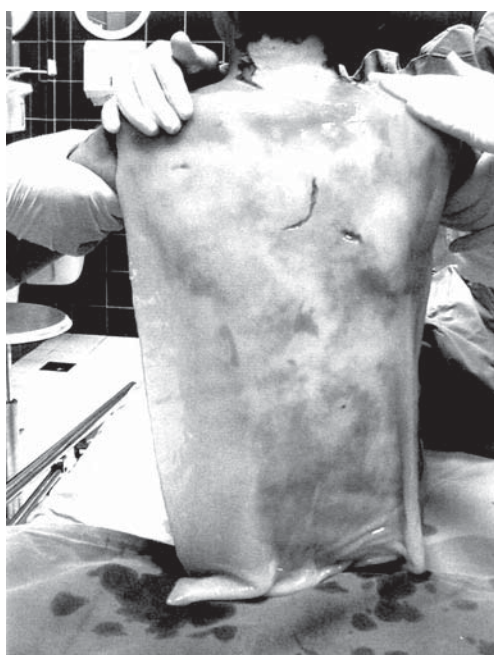
Przykłady zastosowań celulozy bakteryjnej w różnych dziedzinach przedstawiono w tabeli 1. Polimer ten jest wykorzystywany w medycynie i kosmetyce, gdyż po dokładnym usunięciu resztek komórek bakterii i składników podłoża spełnia wszystkie warunki stawiane biomateriałom. W Instytucie Biochemii Technicznej rozwijanych jest kilka kierunków badań nad praktycznymi zastosowaniami BC. Przede wszystkim błony natywne i produkty otrzymane po ich chemicznej modyfikacji są badane w zastosowaniach medycznych (zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych). Ponadto BC jest testowana jako matryca do immobilizacji naturalnych enzymów oraz do produkcji tzw. synzymów (krótkich, kilkuamino-kwasowych peptydów, katalizujących reakcje chemiczne). Najnowsze wyniki naszego zespołu sugerują ponadto interesujące zastosowanie hydrolizatów celulozy w regeneracji starodruków.

Szczególna, nanofibrylarna struktura BC powoduje, że charakteryzuje się ona licznymi cechami czyniącymi z niej doskonały nanobiomateriał, tzn. jest biokompatybilna, biofunkcjonalna, hipoalergiczna oraz nie jest mutagenna, czy teratogenna. W tej chwili, w IBT jest wprowadzany do ciągłej produkcji i dystrybucji produkt medyczny o znaku handlowym CelMat[®], który uzyskał certyfikat typu i weryfikację partii produkcyjnej, a tym samym znak CE o numerze 1435. Wytwarzany w IBT opatrunek celulozowy należy do grupy produktów przełomowych w leczeniu ran przewlekłych. Jego najważniejszymi zaletami jest ściśle dopasowanie do wszelkiego kształtu i rozmiaru ran (ryc. 2), silne i trwałe uwodnienie, zdolność wiązania wydzielin z rany oraz zapewnienie niezbędnej wymiany gazowej z otoczeniem [12]. Dodatkowo wilgotny opatrunek z BC dobrze chroni ranę przed wtórnymi zakażeniami. Istotne jest także, że przy jego stosowaniu obniżone jest odczucie bólu podczas gojenia, a także w trakcie zmiany opatrunku, ponieważ celuloza nie przywiera do skóry i dzięki temu nie

TABELA 1. Zastosowania celulozy bakteryjnej [4] TABLE 1. Applications of bacterial cellulose [4]

Dziedzina	Zastosowanie
Medycyna	Materiał opatrunkowy (sztuczna skóra) przyspieszający gojenie wszelkiego typu ran, implanty naczyń, tchawicy itp., implanty dentystyczne
Kosmetyka	Stabilizator emulsji (kremy, toniki itp.), składnik sztucznych paznokci itp.
Przemysł tekstylny	Tkaniny, sztuczna skóra, materiały o wysokich zdolnościach absorpcyjnych, materiały do produkcji namiotów i sprzętu turystycznego
Papiernictwo	Papier o specjalnych właściwościach, naprawa starodruków, trwałe banknoty i inne wyroby papiernicze
Ochrona środowiska	Ultrafiltracja wody, oczyszczanie ścieków, absorpcja zanieczyszczeń ropopochodnych, toksyn itp.
Produkcja żywności dietetycznej	Jadalna celuloza typu "nata de coco"
Akustyka	Membrany głośnikowe
Badania naukowe	Unieruchamianie białek, chromatografia, składnik podłoży do hodowli

jest uszkodzona regenerująca się tkanka. Dzięki tym wszystkim cechom, gojenie ran chronionych opatrunkami z BC jest szybsze od prowadzonych tradycyjnymi metodami i nie pozostawia blizn [26]. Testowana jest także możliwość wzmocnienia leczniczego działania produkowanych w IBT opatrunków przez nasycanie BC znanymi lekami, czy środkami przeciwbakteryjnymi (np. nanosrebro, lizozym, antybiotyki) bądź, będącymi w fazie badań, substancjami stymulującymi angiogenezę.



RYCINA 2. Opatrunek z celulozy bakteryjnej
FIGURE 2. Burn wound dressing made of bacterial cellulose

Ze względu na biogodność i brak stymulacji układu odpornościowego organizmu obecnie intensywnie badane są zastosowania celulozy bakteryjnej w medycynie implantacyjnej. Odpowiednio formując powierzchnię, na której tworzona jest membrana, można np. uzyskać rurki o dowolnej średnicy i długości, które są doskonałymi implantami naczyń krwionośnych. Po odpowiedniej modyfikacji chemicznej uzyskują większą sztywność i mogą być stosowane jako osłonki zerwanych włókien nerwowych. Wstępne badania *in vivo*, prowadzone przez zespół Profesora Z. Pasięki w Zakładzie Chirurgii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na szczurach rasy Wistar, wskazują na dobrą tolerancję organizmu dla wszczepów celulozowych oraz przyspieszenie regeneracji nerwu obwodowego (dane niepubl.). Odpowiednia obróbka po zakończeniu

hodowli pozwala także uzyskać z BC materiał o charakterze chrząstki, który można zastosować do sporządzania protez. W ramach tej samej współpracy otrzymaliśmy pozytywne wyniki po wszczępieniu protezy tchawicy szczura, otrzymanej z modyfikowanej celulozy. przyszłości materiał chrząstko-podobny może znaleźć liczne inne zastosowania, gdyż możliwe jest uzyskanie dowolnego kształtu implantu.

Bakteryjna celuloza służy też do produkcji materiałów kompozytowych, stosowanych do celów medycznych. Przykładowo, kompozyty z polifosforanem sodu i hydroksyapatytem, o wysokiej odporności mechanicznej zastosowano do regeneracji ubytków kości i leczenia zmian wywołanych osteoporozą [3]. Oprócz tych składników opisane w literaturze materiały kompozytowe, wyprodukowane przy użyciu BC zawierają m.in.: kolagen [48], chitozan [9], modyfikowaną skrobię [32], żywice fenolowe [30], alginian i poliwinylpirolidon [34], polifosforany [3], krzemionkę [27], celulozę roślinną [29] itp. Celulozę bakteryjną łączy się także z siateczkami z włókien syntetycznych, uzyskując materiały o bardziej hydrofilowej powierzchni [36]. Ponadto, w efekcie oplecenia siatki polipropylenowej przez włókna celulozy bakteryjnej uzyskuje się kompozyt o zwiększonej wytrzymałości. Przeprowadzone w naszym zespole wstępne badania *in vivo* na analogicznych materiałach wskazują na zmniejszoną częstość powstawania zrostów (dane npbl). Optymalizacja warunków hodowli *Ga. xylinus* i odpowiednie modyfikacje pochodzące doprowadziły do otrzymania siatki dwustronnie gładkiej, której elastyczność jest odpowiednia do zastosowania jej w technice laparoskopowej (ryc. 3).

Wytwarzanie materiałów kompozytowych zarówno z celulozy bakteryjnej, jak i roślinnej jest ograniczone ich słabą rozpuszczalnością, wysoką hydrofilowością i brakiem grup funkcyjnych wiążących np. grupy aminowe białek. Z tego ostatniego powodu, celulozę bakteryjną poddaje się np. wstępnemu utlenianiu nadjodanem sodu (NaJO_4), powodującemu rozerwanie wiązania C2-C3 w pierścieniu glukopiranozy, prowadzącemu do powstania grup aldehydowych, reagujących z grupami aminowymi. Z kolei działanie chlorkiem tozylu, daje pochodną tozylową celulozy, podstawioną przy C6, co umożliwia wprowadzenie szeregu innych grup funkcyjnych do pierścieni glukozy [15].

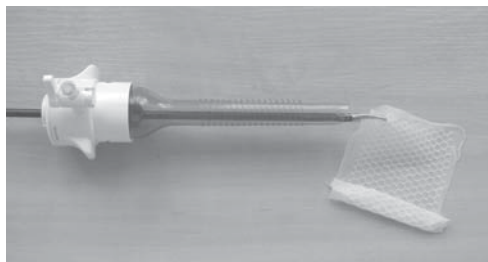
Rozpoczęto też prace nad kompozytami zawierającymi wyizolowane z cząsteczek celulaz moduły wiążące celulozę – CBM (ang. *cellulose binding module*), które mogą pełnić rolę linkerów, wiążących z BC peptydy o działaniu biologicznym oraz białka [33]. Struktura CBM jest dobrze znana (pod tym względem podzielono je na 43 rodziny) i dzięki temu są one produkowane w skali laboratoryjnej. Opatrunki, w których celuloza bakteryjna stanowiłaby nośnik kowalencyjnie związanych enzymów proteolitycznych, mogłyby jeszcze bardziej ułatwić gojenie ran. Wskazują na to wyniki prac odnoszących się do analogicznych opatrunków opartych na matrycach otrzymanych z pochodnych celulozy roślinnej i alkoholu poliwinylowego [54].

PERSPEKTYWY

Unikalne właściwości celulozy bakteryjnej czynią z niej bardzo interesujący nanobiomateriał i sprzyjają poszukiwaniu jej nowych zastosowań. Oczekiwane

w najbliższych latach odkrycia w zakresie molekularnych podstaw biosyntezy tego polimeru zostaną prawdopodobnie znakomicie przyspieszone dzięki realizacji projektu sekwencjonowania genomu *Ga. xylinus*. Opis systemów regulacyjnych, odpowiedzialnych za wydzielanie celulozy przez te bakterie może doprowadzić do konstrukcji nowych, interesujących mutantów, umożliwiających dalszą optymalizację procesów produkcyjnych. Podobnie jak odkrycie w *Ga. xylinus* c-di-GMP otworzyło zupełnie nowy, bardzo istotny rozdział w biologii molekularnej bakterii, poznanie zasad regulacji biosyntezy celulozy może rzucić nowe światło na procesy wytwarzania biofilmów przez inne bakterie. Zapobieganie tworzeniu biofilmów jest istotnym problemem w wielu dziedzinach od medycyny po ochronę środowiska.

Przewidywane przyszłe zastosowania celulozy bakteryjnej wykraczają poza opisane wyżej doskonale materiały opatrunkowe do użytku zewnętrznego i wewnętrznego, oraz różnego rodzaju implanty. Celuloza bakteryjna jest traktowana jako np. potencjalny materiał do produkcji tzw. papieru elektronicznego, czyli lekkich, elastycznych i jednocześnie trwałych, przenośnych wyświetlaczy [40]. Nanofibryle celulozy stanowiłyby w tym przypadku matrycę wiążącą jony metali i barwniki, odwracalnie zmieniające kolor pod wpływem zmian napięcia pola elektrycznego pomiędzy przezroczystymi elektrodami. Ze względu na dużą ilość wiązań wodorowych, stabilizujących strukturę celulozy, jest ona też potencjalnym materiałem do produkcji tzw. elektroaktywnych polimerów [14]. Z kolei, kontrolowana hydroliza BC daje mieszaniny celo-oligosacharydów o określonym stopniu polimeryzacji i krystaliczności, które mogą stanowić dodatek do produkcji papieru lub materiał do produkcji klejów, membran, kompozytów itp. [51].



RYCINA 3. Siatka przepuklinowa z materiału kompozytowego zawierającego celulozę do wszczepień laparoskopowych.

FIGURE 3. A mesh made up from composite material containing cellulose, to be used in laparoscopic hernia treatment

LITERATURA

- [1] BAE SO, SHODA M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; **67**: 45–51.
- [2] BAIER RE. Surface behaviour of biomaterials: the tetra surface for biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med* 2006; **17**: 1057–1062.
- [3] BARUD HS, RIBEIRO CA, CRESPI MS, MARTINES MAU, DEXPERT-GHYS J, MARQUES RFC, MESSADDEQ Y, RIBEIRO SJL. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite materials. *J Therm Anal Calorim* 2007; **87**: 815–818.
- [4] BIELECKI S, KRYSZYŃCZAK A, TURKIEWICZ M, KALINOWSKA H. Bacterial Cellulose. W: *Biopolymers*, vol. 5, Chapter 3, (red.) A Steinbüchel, RH Marchessault, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002: 37–90.
- [5] BIN HMZ, YAHAYA AHJ, LING PLC. *Acetobacter xylinum* as a shape-directing agent for the formation of nano-, micro-sized zinc oxide. *J Mater Sci* 2005; **40**: 6325–6328.
- [6] BROWN L, ELLIOTT T. Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* require host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J Bacteriol* 1996; **178**: 3763–3770.

- [7] CHANGAL, TUCKERMAN JR, GONZALEZ G, MAYER R, WEINHOUSE H, VOLMAN G, AMIKAM D, BENZIMAN M, GILLES-GONZALEZ MA. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* 2001; **40**: 3420–3426.
- [8] CHEN T-HH, BAE Y, FURGESON DY. Intelligent biosynthetic nanobio-materials (IBNs) for hyperthermic gene delivery. *Pharm Res* 2007; **25**: 683–688.
- [9] CIECHAŃSKA D. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres Textiles Eastern Eur* 2004; **12**: 69–72.
- [10] COUCHERON DH. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. *J Bacteriol* 1991; **173**: 5723–5731.
- [11] CRESCENZI V. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol Prog* 1995; **11**: 251–259.
- [12] CZAJA W, KRYSZYŃOWICZ A, BIELECKI S, BROWN MR. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 2006; **27**: 145–151.
- [13] EVANS BR, O'NEILL HM. Effect of surface attachment on synthesis of bacterial cellulose. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; **121–124**: 439–450.
- [14] FINKENSTADT VL. Natural polysaccharides as electroactive polymers. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; **67**: 735–745.
- [15] HEINZE T, KOSCHELLA A, MAGDALENO-MAIZA L, ULRICH AS. Nucleophilic displacement reactions on tosyl cellulose by chiral amines. *Polymer Bull* 2001; **46**: 7–13.
- [16] ECKER M, VÖLKER U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 2001; **44**: 35–91.
- [17] ISHIDA T, SUGANO Y, NAKAI T, SHODA M. Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; **66**: 1677–1681.
- [18] JENAL U, MALONE J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 2006; **40**: 385–407.
- [19] JONAS K, EDWARDS AN, SIMMR, ROMEO T, RÖMLING U, MELEFORS Ö. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* 2008; **70**: 236–257.
- [20] KATO N, SATO T, KATO C, YAJIMA M, SUGIYAMA J, KANDA T, MIZUNO M, NOZAKI K, YAMANAKA S, AMANO Y. Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter xylinus* cells under high-hydrostatic pressure. *Extremophiles* 2007; **11**: 693–698.
- [21] KARAKOTIAS, MONTEIRO-RIVIERE NA, AGGRAWAL R, DAVIS JP, NARAYAN RJ, SELF WT, MCGINNIS J, SEAL S. Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications. *JOM* 2008; **60**: 33–36.
- [22] KAWANO S, TAJIMA K, UEMORI Y, YAMASHITA H, ERATA T, MUNEKATA M, TAKAI M. Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: comparison of cellulose synthetic ability between ATCC23769 and ATCC53582. *DNA Res* 2002; **9**: 149–156.
- [23] KELLY Y, KIM MA. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2007; **3**: 103–110.
- [24] KIMURA S, CHEN HP, SAXENA IM, BROWN RM JR, ITOH T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5668–5674.
- [25] KORNMANN H, DUBOC P, MARISON I, von STOCKAR U. Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 6091–6098.
- [26] KRYSZYŃOWICZ A, CZAJA W, POMORSKI L, KOŁODZIEJCZYK M. The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent*, Gent: 2000; **65**: 213–220.
- [27] MAEDA H, NAKAJIMA M, HAGAIWARA T, SAWAGUCHI T, YANO S. Bacterial cellulose/silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. *J Mater Sci* 2006; **41**: 5646–5656.
- [28] MEYERS MA, LIN AYM, LIN YS, OLEVSKY EA, GEORGALIS S. The cutting edge: sharp biological materials. *JOM* 2008; **60**: 19–24.
- [29] MORMINO R, BUNGAY H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **62**: 503–506.
- [30] NAKAGAITO AN, IWAMOTO S, YANO H. Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Appl Phys* 2005; **A80**: 93–97.
- [31] NAKAI T, TONOUCHE N, KONISHI T, KOJIMA Y, TSUCHIDA T, YOSHINAGA F, SAKAI F, HAYASHI T. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14–18.

- [32] ORTS WJ, SHEY J, IMAM SH, GLENN GM, GUTTMAN ME, REVOL J-F. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. *J Polymers Environment* 2005; **13**: 301–306.
- [33] PINTO R, CARVALHO J, MOTA M, GAMA M. Large-scale production of cellulose-binding domains. Adsorption studies using CBD-FITC conjugates. *Cellulose* 2006; **13**: 557–569.
- [34] RAMANA KV, GANESAN K, SINGHL. Pervaporation performance of a composite bacterial cellulose membrane: dehydration of binary aqueous-organic mixtures. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; **22**: 547–552.
- [35] RICKERT D, LENDLEIN A, PETERS I, MOSES MA, FRANKE R-P. Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur Arch Otorhinolarygol* 2006; **263**: 215–222.
- [36] RING DF, NASHED W, DOW T. Liquid loaded pad for medical applications. *US Patent* 4,788,146; 1988.
- [37] RÖMLING U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* 2002; **153**: 205–212.
- [38] RÖMLING U, AMIKAM D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 218–228.
- [39] SETO A, SAITO Y, MATSUSHIGE M, KOBAYASHI H, SASAKI Y, TONOUCHI N, TSUCHIDA T, YOSHINAGA F, UEDA K, BEPPU T. Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; **73**: 915–992.
- [40] SHAH J, BROWN MR JR. Towards electronic paper. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; **66**: 352–355.
- [41] SHIGEMATSU T, TAKAMINE K, KITAZATO M, MORITA T, NARITOMI T, MORIMURA S, KIDA K. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (*gdh*)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J Biosci Bioeng* 2005; **99**: 415–422.
- [42] SPANO G, MASSA S. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond *Bacillus subtilis*. *Crit Rev Microbiol* 2006; **32**: 77–86.
- [43] STANDAL R, IVERSEN TG, COUCHERON DH, FJAERVIK E, BLATNY JM, VALLA S. A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. *J Bacteriol* 1994; **176**: 665–672.
- [44] TAL R, WONG HC, CALHOON R, GELFAND D, FEAR AL, VOLMAN G, MAYER R, ROSS P, AMIKAM D, WEINHOUSE H, COHEN A, SAPIR S, OHANAP, BENZIMAN M. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 1998; **180**: 4416–4425.
- [45] THOMPSON DN, HAMILTON MA. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Appl Biochem Biotechnol* 2001; **91–93**: 503–507.
- [46] VALLA S, COUCHERON DH, KJOSBAKKEN J. *Acetobacter xylinum* contains several plasmids: evidence for their involvement in cellulose formation. *Arch Microbiol* 1983; **134**: 9–11.
- [47] WARREN HH. Nanomaterials: nomenclature, novelty, and necessity. *JOM* 2004; **56**: 13–18.
- [48] WIEGAND C, ELSNER P, HIPLER U-C, KLEMM D. Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I *in vitro*. *Cellulose* 2006; **13**: 689–696.
- [49] WILLIAMS WS, CANNON RE. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl Environ Microbiol* 1989; **55**: 2448–2452.
- [50] WONG HC, FEAR AL, CALHOON RD, EICHINGER GH, MAYER R, AMIKAM D, BENZIMAN M, GELFAND DH, MEADE JH, EMERICK AW, et al. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8130–8134.
- [51] XIANG Q, KIM JS, LEE YY. A comprehensive kinetic model for dilute-acid hydrolysis of cellulose. *Appl Biochem Biotechnol* 2003; **105–108**: 337–357.
- [52] YAMANAKAS, ISHIHARAM, SUGIYAMAJ. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* 2000; **7**: 213–225.
- [53] YANG H, LIU MY, ROMEO T. Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the *CsrA* gene product. *J Bacteriol* 1996; **178**: 1012–1017.
- [54] YODANOVA TN, RESHETOV IV. Modern wound dressings: making and properties. II. Wound dressings containing immobilized proteolytic enzymes (a review). *Pharmaceut Chem J* 2006; **40**: 430–434.
- [55] ZHANG D, QI L. Synthesis of mesoporous titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes. *Chem Commun* 2005; **2735–2737**.

Stanisław BIELECKI

Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka ul. Stefanowskiego 4/10 , 90-924 Łódź

e-mail: stanb@p.lodz.pl