

Primjena bakterijske nanoceluloze (BNC) u biotehnologiji i biomedicini

Barišić, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:009010>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Biotehnologija

Magdalena Barišić

7415/BT

**PRIMJENA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)
U BIOTEHNOLOGIJI I BIOMEDICINI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIMJENA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC) U BIOTEHNOLOGIJI I BIOMEDICINI

Magdalena Barišić, 0058210733

Sažetak: Bakterijska nanoceluloza (BNC) je izrazito tanka, nanofibrilarna sirovina koja posjeduje jedinstvenu kombinaciju svojstava kao što su visoka kristaliničnost (84%-89%) i stupanj polimerizacije, velika površina (visoki udjel fibrila s promjerom od 20 do 100 nm), visoka fleksibilnost i vlačna snaga (Youngov modul od 15 do 18 GPa), kao i kapacitet zadržavanja vode (100 puta veći od svoje mase). Zahvaljujući velikoj strukturnoj čistoći jer nema lignina, hemiceluloze i pektina, BNC se smatra ne citotoksičnom, ne genotoksičnom i visoko kompatibilnom sirovinom, koja privlači interese znanstvenika iz različitih područja istraživanja, a posebice biomedicine. U ovom radu su pregledno prikazani biotehnološki aspekti proizvodnje BNC (vrste bakterija, izvori ugljika i hranjive podloge) i različite *in situ* i *ex situ* metode, primijenjene za BNC modifikaciju, posebice biogeničnog pristupa za primjenu u regenerativnoj biomedicini.

Ključne riječi: bakterijska nanoceluloza, fermentacija, BNC modifikacija, kompoziti

Rad sadrži: 37 stranica, 7 slika, 1 tablicu, 123 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Datum obrane: 01. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

BACTERIAL NANOCELLULOSE (BNC) APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICINE

Magdalena Barišić, 0058210733

Abstract: Bacterial nanocellulose (BNC) is ultrafine, nanofibrillar material with an exclusive combination of properties such as high crystallinity (84%–89%) and polymerization degree, high surface area (high aspect ratio of fibers with diameter 20–100 nm), high flexibility and tensile strength (Young modulus of 15–18 GPa), and high water-holding capacity (over 100 times of its own mass). Due to high structural purity because of absence of lignin, hemicellulose and pectin, BNC is considered as a non-cytotoxic, non-genotoxic and highly biocompatible material, attracting interest of scientists in diverse areas with hallmarks in biomedicine. The presented work summarizes the biotechnological aspects of BNC production (bacterial strains, carbon sources and media) and versatile *in situ* and *ex situ* methods applied in BNC modification, especially towards bionic design for applications in regenerative biomedicine.

Keywords: Bacterial nanocellulose, Fermentation, BNC modification, Composite materials

Thesis contains: 37 pages, 7 figures, 1 table, 123 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: 1st September, 2020

SADRŽAJ	5
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Biljna celuloza i bakterijska nanoceluloza (BNC)	2
2.2. Bakterije s visokom sposobnošću proizvodnje BNC	3
2.3. Biosintetski put BNC	4
2.4. Uzgoj i morfologija BNC	6
2.4.1. Načini uzgoja i hranjive podloge	6
2.4.2. Morfologija	7
2.5. Pročišćavanje BNC	9
2.6. Svojstva BNC	10
2.6.1. Mehanička svojstva	10
2.6.2. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode	10
2.6.3. Veličina pora i morfologija vlakana	12
2.7. KOMPOZITI BNC	13
2.7.1. Priprava BNC kompozita	19
2.8. Optimizacija bioloških svojstava i antibakterijske aktivnosti	20
3. ZAKLJUČAK	25
4. LITERATURA	26

1. UVOD

Bioekonomija se temelji na učinkovitoj upotrebi različitih prirodnih supstrata i procesa za proizvodnju hrane i proizvoda koji se temelje na biološkoj osnovi i bioenergiji. Primjer racionalne uporabe prirodnih resursa je proizvodnja bakterijske nanoceluloze (BNC).

BNC je prirodni polimer, kojeg mogu sintetizirati mnoge bakterijske vrste, a među njima su bakterije octene kiseline vrste *Komagateibacter xylinus*, koje su priznati i najučinkovitiji proizvođači nanoceluloze. Ove bakterije stvaraju izvanstanični, kemijski čisti β -glukan, koji omogućava njihov opstanak u prirodnom okruženju jer se stanice čuvaju na površini hranjive podloge, zarobljene u želatinoznim membranama poput kože, koje se sastoje od isprepletenih nanoceluloznih vlakana. Takva samo-imobilizacija stanica promiče učinkovit transport hranjivih tvari i kisika, što je bitno za ove aerobne bakterije.

Zbog velikog kapaciteta zadržavanja vode (voda čini oko 98% vlažne mase membrane) ovaj polisaharid štiti svoje proizvođače od isušivanja. Celulozna pelikula (opna) koju sintetiziraju bakterije octene kiseline štiti ih, također, od drugih nepovoljnih čimbenika okoliša, poput UV zračenja.

BNC koju sintetiziraju bakterije *Komagateibacter* odlikuju se jedinstvenim osobinama, koje proizlaze iz njihove prirodne biološke uloge, poput visoke hidrofilnosti, kristaliničnosti, čistoće i sposobnost zadržavanja vode, mehaničke čvrstoće i otpornosti na odumiranje, izvrsne biokompatibilnosti i nedostatka citotoksičnosti i alergnosti. Zbog tih svojstava i sposobnosti bioloških, kemijskih i fizikalnih modifikacija, ovaj prirodni biomaterijal ima brojne primjene u proizvodnji različitih bioproizvoda i smatra se „biološkom bazom“ za razvoj novih materijala na raznim područjima, poput proizvodnje i prerade hrane, elektronike, proizvodnje posebnih vrsta papira, u biotehnološkoj, kemijskoj i tekstilnoj industriji, te posebice u medicini. Sve veća primjena BNC i njenih derivata u raznim granama industrije i u medicini potaknula je brojna i intenzivna istraživanja o poboljšanju proizvodne učinkovitosti, uz smanjenje troškova biosinteze i modifikacija BNC.

U ovom radu navedene su glavne značajke BNC, biotehnološka proizvodnja, fizikalno-kemijska svojstva, a naglasak je dan na specifičnu biomedicinsku primjenu: pripremu kompozita BNC koji služe kao pokrovi za previjanje rana, odnosno zavoji. Navedeni su postupci biotehnološke pripreme kompozita i ukazano je na antimikrobno djelovanje ovih pripravaka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biljna celuloza i bakterijska nanoceluloza (BNC)

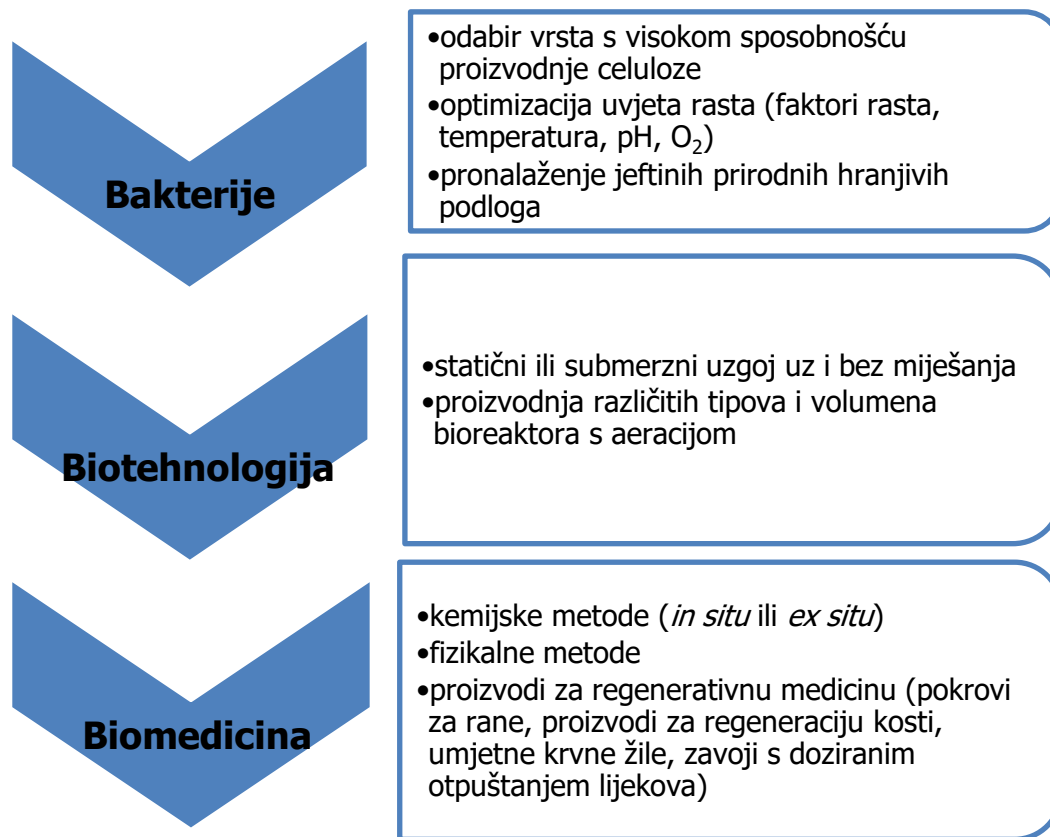
Celuloza je najbrojniji prirodni polimer koji se dobiva iz obnovljivih izvora. Sastoji se od linearnog homopolisaharida sastavljenog od β -D-glukopiranoznih jedinica povezanih β -1,4 glikozidnim vezama (Cannon i Anderson, 1991). Najprimjenjivaniji prirodni izvor celuloze je drvo zbog visoke raspoloživosti koja udovoljava zahtjevima papirne industrije (Klemm i sur., 2005). Međutim, i razne biljke sadrže velike količine celuloze, poput konoplje, lana ili pamuka (Fernandes i sur., 2017). Uz ove izvore, celulozu mogu, između ostalog, proizvoditi i morske alge, plijesni i neke vrste bakterija, a najznačajnije su nepatogene bakterije iz roda *Komagataibacter*, kao što je *K. xylinus*, bivše vrste *Acetobacter xylinum* i *Gluconacetobacter xylinus* (Saxena i Brown, 2012). Nekoliko sojeva *K. xylinus* proizvodi izvanstaničnu celulozu tvoreći biofilm različite debljine s ciljem održavanja visoke koncentracije kisika potrebnog bakterijama blizu i na površini, koji služi kao zaštitna barijera protiv prirodnih neprijatelja, UV-zračenja i sušenja.

Osim što je biorazgradiva, netoksična i biokompatibilna, jedna od glavnih prednosti bakterijske nanoceluloze (BNC) u odnosu na biljnu celulozu je i njena jedinstvena prirodna čistoća što omogućuje njeno izravno korištenje. Kemijski je ekvivalent biljnoj celulozi, ali ne sadrži nusproizvode poput lignina, pektina, hemiceluloze i drugih sastojaka lignoceluloznih materijala (Rahman i Netravali, 2016). Dobiva se fermentacijom i sadrži samo mikrobnostanice, hranjive tvari i druge sekundarne metabolite koji se mogu lako ukloniti, dajući celulozu visoke čistoće. Iako je molekularna formula BNC slična biljnoj celulozi, mehanička i fizička izvanredna svojstva BNC proizlaze iz njene jedinstvene 3D strukture koja se znatno razlikuje od strukture celuloze biljnog izvora, jer se BNC agregira u obliku dugih vlakana širine 1,5 nm, pružajući veću površinu, elastičnost, otpornost i fleksibilnost. BNC čini jedinstvena mreža (matriks), sastavljena od isprepletenih tankih vlakana promjera više od 100 puta manjih od vlakana biljnog podrijetla (Klemm i sur., 2005).

BNC ima brojna svojstva koja ju čine idealnim pokrovom za zaštitu ozlijeđenih tkiva u obliku zavoja, posebno kod opekline, regeneracije tkiva te kao privremeni nadomjestak kože. Neke korisne karakteristike BNC-a za ove posebne primjene su činjenica da je netoksična, nekancerogena i biokompatibilna te ima sposobnost zadržavanja vlage, apsorpiranja likvora iz ozlijeđenih tkiva i ubrzavanja granulacije (Khalid i sur., 2017).

Za učinkovitu proizvodnju BNC, nužne su učinkovite i stabilne bakterijske vrste, uz zahtjev da mogu rasti i razmnožavati se na hranjivim podlogama koje nisu skupe i mogu se koristiti i u laboratorijskim i u industrijskim uvjetima proizvodnje. Sintetizirana BNC se relativno

jednostavno izdvaja iz fermentirane hranjive podloge i može se kasnije modificirati ovisno o željenoj primjeni (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz najvažnijih aspekata primjene BNC u biotehnologiji i biomedicini

2.2. Bakterije s visokom sposobnošću proizvodnje BNC

BNC je visoko-kristalinični linearni biopolimer glukoze, kojeg proizvodi bakterija *Komagataibacter xylinus* (ranije imenovana *G.xylinus*, odnosno *A. xylinum*) oksidacijskom fermentacijom u kompleksnim i kemijski definiranim hranjivim podlogama (Rehm, 2009). Ovaj nefotosintetski organizam može zadržavati šećer, glicerol, glukozu i neke druge organske materijale prije nego što ih pretvori u čistu nanocelulozu (Son i sur., 2001). Vrlo malo vrsta bakterija može proizvesti nanocelulozu. Međutim, gram-negativna bakterija *K. xylinus* izlučuje veliku količinu celuloze kao mikrovlakna iz niza mjesta sinteze duž longitudinalne osi stanice (Tanaka i sur., 2000). Ta aerobna gram-negativna bakterija učinkovito fermentira pri pH od 3 do 7 i u temperaturnom rasponu od 25 do 30° C, koristeći saharide kao izvor ugljika (Castro i sur., 2011). Vrhunska fizikalno-kemijska svojstva BNC-a uglavnom su rezultat njene mikrovlaknaste strukture, poput izvrsne vlačne

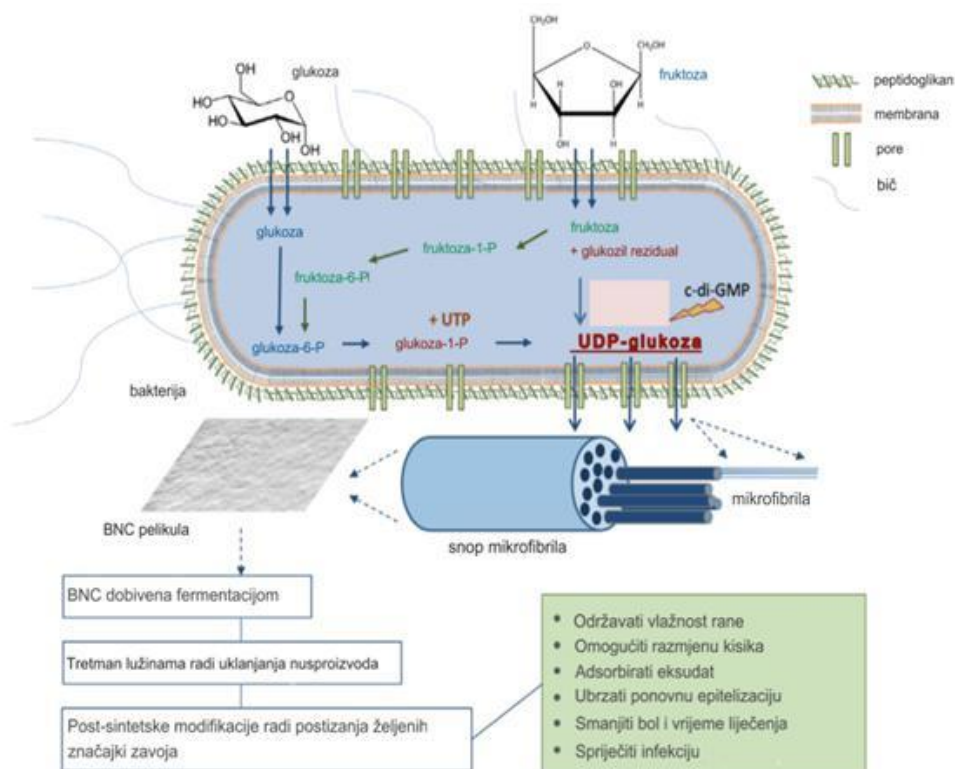
čvrstoće, visokog stupnja polimerizacije i kristalnosti. Mikrovlakna sa svakog sintetskog mjesta sastavljaju se tako da formiraju veliku vrpču nanoceluloze u mediju za rast. Formirane vrpce i pridružene stanice isprepliću se kako bi se stvorila valovita pelikula, što omogućuje stabilnim i strogo aerobnim bakterijama da se razvijaju u višem tlaku kisika koji se nalazi na površini medija za rast (Klemm i sur., 2011). Iako se proizvodnja BNC uglavnom istraživala u *G. xylinus*, neki mikroorganizmi, kao što su druge vrste *Agrobacterium tumefaciens*, rodova *Gluconacetobacter*, *Rhizobium* spp., i gram-pozitivne vrste *Sarcina ventriculli*, također pokazuju sposobnost proizvodnje ovog biopolimera (Tanskul i sur., 2013).

2.3. Biosintetski put BNC

Biosinteza BNC je višestupanjski proces koji uključuje pojedine gene i operon nazvan bcsABCD (sinteza bakterijske celuloze), prvo identificiran u *K. xylinus* (Umeda i sur., 1999.), koji kodira proteine i enzime koji povezuju linearnu polimerizaciju glukoze sa stvaranjem 3D strukture nanoceluloze (Ross i sur., 1991). Iako su bcsA i bcsB esencijalni geni, maksimalan prinos proizvodnje BNC postiže se samo ekspresijom cijelog operona, u kojem se sastav i strukturna organizacija jako razlikuju među vrstama (Perez-Mendoza i sur., 2015).

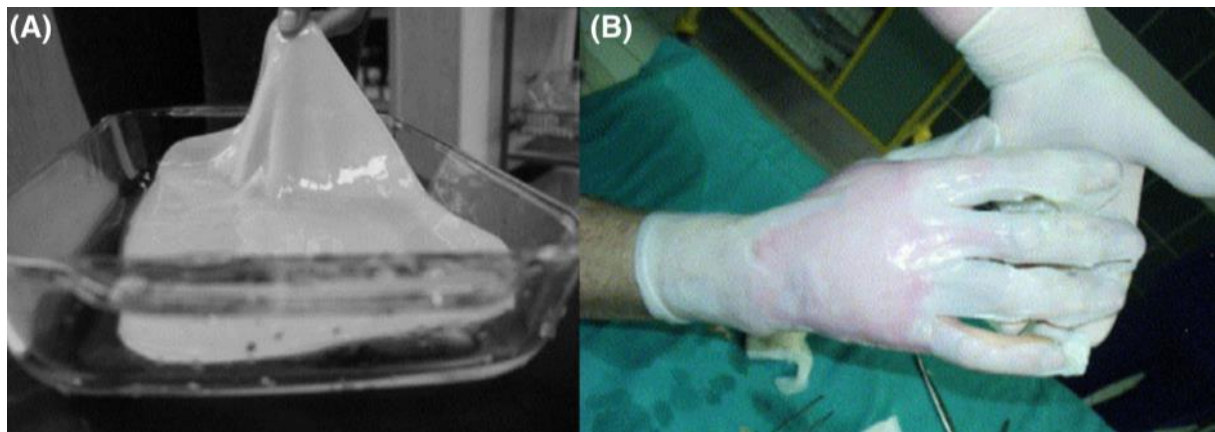
Biosinteza BNC zahtijeva četiri enzimska koraka: (1) fosforilaciju glukoze glukokinazom u glukoza-6-fosfat, (2) izomerizaciju glukoze-6-fosfata u glukozu-1-fosfat fosfoglukomutazom, (3) pretvorbu glukoza-1-fosfata u uridin difosfat glukozu (UDP-glukoza) pomoću UDP-glukoze pirofosforilaze, i (4) sintezu nanoceluloze iz UDP-glukoze celuloza sintazom (Ross i sur., 1991). UDP-glukoza je izravni prekursor nanoceluloze koji je čest u mnogim organizmima (Morgan i sur., 2013). Smatra se da UGPaza ima važnu ulogu u sintezi nanoceluloze, jer je približno 100 puta aktivnija u producentima nanoceluloze od bakterija koje ne proizvode celulozu (Valla i sur., 1989). Kada se disaharidi, poput saharoze i maltoze, koriste kao izvor ugljika za bakterije koje stvaraju celulozu, biosinteza BNC počinje s hidrolizom disaharida u monosaharide, poput glukoze i fruktoze (Slika 2). Iako su putevi i mehanizmi sinteze UDPGlc relativno poznati, molekularni mehanizmi polimerizacije glukoze koji stvaraju duge i nerazgranate lance nanoceluloze znanstvenicima su još uvijek nepoznanica (Valla i sur., 1989). Sinteza celuloze u mikroorganizmima i biljkama slijedi dva međufazna stadija: (i) stvaranje β -1,4-glukanskih lanaca polimerizacijom glukoznih jedinica i (ii) sintezu i kristalizaciju lanca celuloze (Czaja i sur., 2007). BNC nastaje između vanjske i citoplazmatske membrane stanice (De Ley i sur., 1984). Molekule celuloze se najprije sintetiziraju u bakterijama. Te se molekule potom zakreću kroz komponente koje izvode nanocelulozu da bi tvorile protofibrile, promjera otprilike 2-4 nm. Mikrofibrile u obliku vrpce

od približno 80 nm sastavljene su iz ovih protofibrila (Iguchi i sur., 2000). Novoformirani lanci celuloze potom se izlučuju preko stanične stijenke kroz 50–80 ekstruzijskih pora, poredanih duž duge osi stanice kao što je prikazano na Slici 2 (Krasteva i sur., 2017).



Slika 2. Shematski prikaz koraka uključenih u proizvodnji BNC, od molekularnog mehanizma biosinteze UDP-glukoze u bakterijama do izvedenih post-sintetskih modifikacija BNC-a, ističući trodimenzionalnu strukturu formiranu pomoću izlučenih lanaca glukoze i značajki čija je prisutnost poželjna u materijalima za zavoje (Krasteva i sur., 2017)

Nakon završetka prvog stupnja organizacije - stvaranja polimera - linearni se lanci spajaju u nanovlakna od 10–15 polimernih lanaca i naknadno se raspoređuju u mikrofibrile (100 puta manja od onih iz biljne celuloze), a zatim u snopove mikrofibrila. Grupiranjem takvih snopova dobivaju se celulozne vrpce debljine 3–4 nm i širine 70–80 (Slika 2), stvarajući 3D mrežu koja je stabilizirana vodikovim vezama koje uspostavljaju intra- i interkemijske veze između listova celuloze, tvoreći gustu i želatinoznu membranu koju karakterizira visoka mehanička čvrstoća (Slika 3A) u kombinaciji s velikom savitljivošću koja joj omogućuje savršeno prijanjanje na ranjeno područje (Slika 3B) (Chawla i sur., 2009).



Slika 3. Sintetizirana BNC; A) Hidrirana BNC membrana visoke mehaničke čvrstoće; B) Rukavica izrađena od BNC za liječenje rana na rukama (Czaja i sur., 2006)

2.4. Uzgoj i morfologija BNC

2.4.1. Načini uzgoja i hranjive podloge

Postoje dva glavna načina sinteze BNC: (i) statični uzgoj koji rezultira rastom gustih, vlaknastih pelikula BNC na međugranici zraka i tekuće hranjive podloge (George i sur., 2005); i (ii) miješana kultura, u kojoj se nanoceluloza proizvodi dispergiranim postupkom u tekućoj hranjivoj podlozi, što rezultira sintezom sitnih peleta ili suspendiranih pojedinačnih mikrofibrila (Algar i sur., 2015). Odabir postupka (statični ili uz miješanje) ovisi o konačnoj primjeni BNC- budući da se fizikalne, morfološke i mehaničke karakteristike sintetizirane BNC razlikuju ovisno o procesu uzgoja. Primjerice, nanoceluloza dobivena metodom uzgoja uz miješanje posjeduje nižu mehaničku čvrstoću u usporedbi s nanocelulozom dobivenom statičnim uzgojem. Nadalje, miješanje rezultira nižim prinosima u usporedbi sa statičnim uzgojem i veća je vjerojatnost mutacije radnog soja mikroorganizma, što može utjecati na prinos BNC (Watanabe i sur., 1998). S druge strane, za statični uzgoj je potrebna veća površina i duže traje uzgoj (Tyagi i Suresh, 2016).

Najvažniji čimbenik za utvrđivanje konačne cijene BNC je vrsta i izvor hranjive podloge. Značajni aspekt u sintezi BNC je odabir jeftine hranjive podloge, koja može povećati prinos BNC i primijeniti ju kao ekonomski isplativo rješenje za upotrebu u različitim područjima (Padmanban i sur., 2015). U posljednje vrijeme studije su se uglavnom usredotočile na povećanje iskorištenja industrijskog i poljoprivrednog otpada kao zamjenu za skuplje izvore hranjiva kako bi se ova proizvodnja učinila „zelenijom“ i jeftinijom. Važni su čimbenici dizajn bioreaktora i načini miješanja (Ul-Islam i sur., 2015). Postoje tri različite vrste hranjivih podloga, među kojima je najpoznatija i najčešće korištena Hestrin-Schramm podloga

(Schramm i Hestrin, 1954), a uz nju se u posljednje vrijeme često koriste Yamanaka (Yamanaka i sur., 1989) i Zhou (Zhou i sur., 2007) podloge. Za ove kemijski definirane hranjive podloge empirijski su utvrđene optimalne koncentracije. Jeftinije kompleksne podloge mogu se sastojati od industrijskih, poljoprivrednih i šumarskih nusproizvoda i otpadnih materijala, koji se smatraju nekonvencionalnim izvorima ugljika i/ili dušika (Foresti i sur., 2015). Istraživanja su pokazala da je u hranjivim podlogama po Zhou i Hestrin-Schrammu postignut veći prinos BNC nego u Yamanaka hranjivoj podlozi (Ruka i sur., 2012). Iako je koncentracija izvora ugljika u Hestrin-Schramm podlozi upola manji nego u Zhou podlozi, postignuti su najveći prinosi BNC. Stoga se može zaključiti da na prinos proizvodnje BNC utječu vrsta, količina i sastav hranjive podloge. Proizvodnja BNC mikroorganizmima, poput *K. xylinum*, ovisi o važnim parametrima, kao što su primijenjena kultura, izvor ugljikohidrata, soj bakterija, kiselost i temperatura (Mohammadkazemi i sur., 2015). U usporedbi s ostale dvije hranjive podloge, pH u Hestrin-Schramm podlozi najmanje se smanjuje tijekom sinteze BNC, što znači da ta podloga ima bolji puferski kapacitet od ostale dvije. Također je zabilježeno da su fibrili BNC sintetizirani u Zhou hranjivoj podlozi bili više isprepleteni od onih formiranih u druge dvije podloge. Isto tako je istraživanjima dokazano da je širina BNC stvorene u Hestrin-Schramm podlozi bila veća od one formirane u drugim dvjema podlogama. Drugi podatak upućuje na to da se kristaliničnost BNC može kontrolirati prema vrsti primijenjene hranjive podloge i uvjetima uzgoja (Ruka i sur., 2012).

Nedavna istraživanja uglavnom su se usredotočila na odnos karakteristika BNC i izvora ugljika, što je važno za njenu primjenu (Huang i sur., 2015). Rezultati su pokazali da, iako se kemijska struktura proizvedene BNC ne mijenja, iskorišteni izvor ugljika može utjecati na kapacitet zadržavanja vode (engl. Water Holding Capacity; WHC) u strukturi BNC. WHC ima pozitivnu i značajnu korelaciju s površinom BNC i poroznosti), razinu polimerizacije, molekulsku masu, indeks kristaliničnosti (67–96%), prosječnu veličinu kristala (5,7–6,4 nm), viskoznost, brzinu prijenosa kisika i vodene pare, kao i mehanička svojstva (Tsouko i sur., 2015). Nekoliko istraživanja pokazalo je da su veće količine BNC sintetizirane kada su glukoza, fruktoza i manitol korišteni kao izvori ugljika. Prema gore navedenim rezultatima provedenih istraživanja, kod odabranog načina uzgoja, trajanje vremena inkubacije ima značajan utjecaj na brzinu proizvodnje i karakteristike dobivene BNC, poput poroznosti membrane, kompaktnosti pelikula, kristaliničnosti i stupnja polimerizacije (Cerruti i sur., 2016).

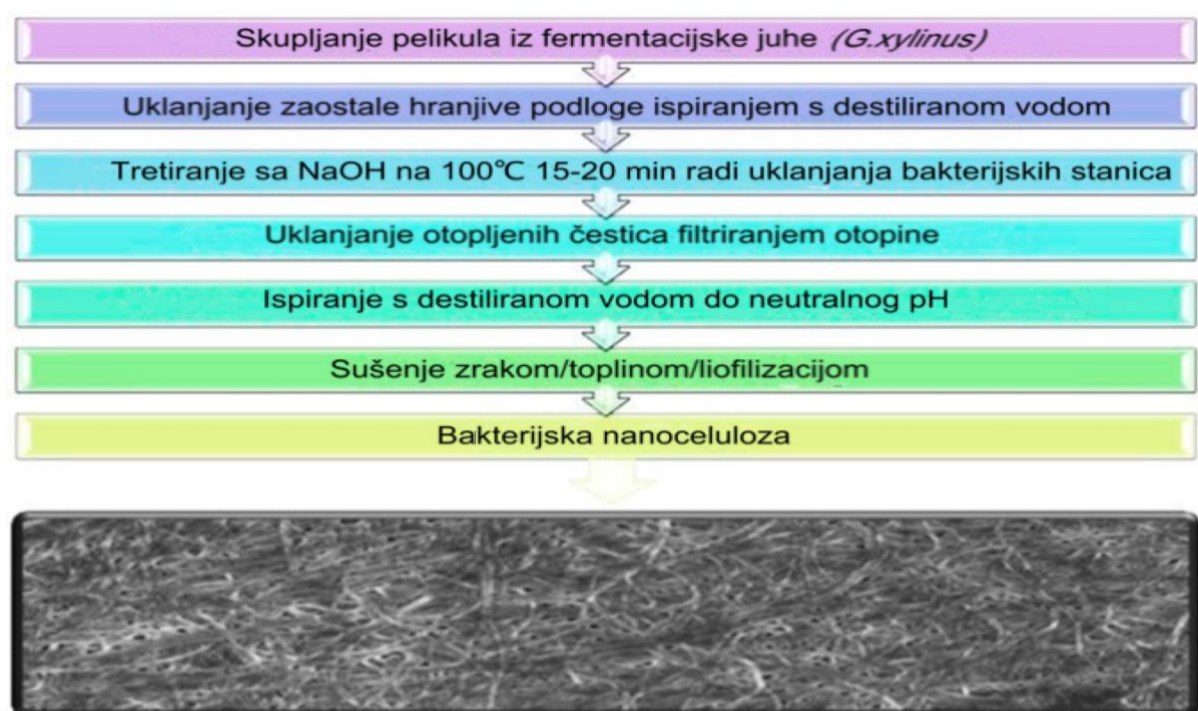
2.4.2. Morfologija

BNC čine elementarna vlakna, odnosno mikrofibrili i makrofibrili klasificirani prema morfologiji. Nanoceluloza se sastoji od dva glavna područja: s visokom i niskom uređenošću.

Mikrofibrili BNC sintetiziraju se u području s visokim stupnjem uređenosti, koja je kristalinična, a u amorfnom području se nisko poredani makrofibrili sastoje od kristaliničnih i amorfnih dijelova (Fink i sur., 1993). Nekoliko istraživanja na promjenama morfologije BNC uključilo je modifikaciju bakterijskih stanica. Koristan postupak za usklađivanje karakteristika BNC s njenom primjenom uključuje manipulaciju biogenezom BNC. Primjerice, modificirana BNC proizvedena je uzgojem stanica BNC u hranjivoj podlozi s dodatkom hitosana, a sintetizirana nanoceluloza je uporabljena za primjenu pri previjanja rana (Ciechanska, 2004). Seifert i sur. (2004) konstruirali su modificiranu BNC dodatkom metilceluloze, karboksimetil celuloze i polivinilnog alkohola s kontroliranim sadržajem vode za biomedicinsku primjenu. Kompoziti BNC s nano veličinom mogu se proizvesti manipulacijom biogenezom, koja ima za cilj omogućiti BNC vlaknima i polimeru da se ko-kristaliziraju tijekom procesa stvaranja vrpce. Bodin i sur. proizveli su BNC epruvete s raznim oblicima na temelju zahtjeva za proizvodima, što ju je učinilo zanimljivim biomaterijalom za istraživanje i uporabu u različitim biomedicinskim primjenama, uključujući koštani grafitni materijal, kao i držače za inženjering tkiva hrskavice i krvnih žila (Bodin i sur., 2007). Osim manipuliranja nekim morfološkim karakteristikama BNC, poput oblika i veličine, mikroskopska morfologija također se može izmijeniti na neki način. Watanabe i Yamanaka (1995) i Hult i sur. (2003) pokazale su da visoki udjel kisika tijekom statičkog kultiviranja može povećati gustoću, a samim tim i žilavost BNC membrane. Neujednačena brzina miješanja i dodavanje boja također su pokazale veliki utjecaj na kombinaciju sub-elementarnih mikrofibrila, što naknadno smanjuje kristaliničnost mreže BNC (Watanabe i sur., 1998). Različite morfologije BNC izravno utječu na njena mehanička svojstva i prijanjanje stanica na materijal. Tang i sur. (2010) proizveli su BNC mreže različitih veličina i poroznosti kada su promijenjeni uvjete fermentacije (vrijeme uzgoja i volumen inokuluma) i intervencije nakon obrade (alkalne metode obrade i sušenja). Bäckdahl i sur. (2008) primijenili su novi pristup uvođenju mikroporoznosti u epruvete BNC, koje se namjeravaju koristiti kao držači za krvne žile proizvedene tkivnim inženjeringom.

2.5. Pročišćavanje BNC

Nakon fermentacije dobivena BNC nije čista pa zahtijeva pročišćavanje. Razlog su nečistoće poput stanica i/ili sastojaka hranjive podloge. Fermentirana hranjiva podloga mora se pročistiti da bi se dobila čista nanoceluloza. Postupak pročišćavanja BNC je prikazan na Slici 4. (Jung i sur., 2005). Najopsežniji primijenjeni postupak pročišćavanja u hranjivoj podlozi za uzgoj uključuje upotrebu alkalnih otopina poput natrijevog i kalijevog hidroksida, organskih kiselina, poput octene kiseline, pranje smjese nekoliko puta vrućom vodom ili povratnu osmozu. Navedeni stupnjevi pročišćavanja mogu se primijeniti odvojeno ili zajedno (Kongruang, 2008). Tipičan postupak pročišćavanja BNC koja sadrži imobilizirane stanice uključuje sljedeće korake: (i) obradu alkalnim otopinama, poput NaOH/KOH/Na₂CO₃ na 100°C 15-20 min radi uklanjanja mikrobnih stanica, (ii) filtraciju otopine s ciljem uklanjanja otopljenih tvari i (iii) ispiranje filtrata destiliranom vodom sve do neutralne pH vrijednosti.



Slika 4. Postupak pročišćavanja BNC iz *K. xylinus* (Jung i sur., 2005)

2.6. Svojstva BNC

2.6.1. Mehanička svojstva

Strukturni raspored vlakana BNC daje mehanička svojstva koja ju razlikuju od celuloze dobivene iz biljaka, uključujući viši stupanj kristalnosti (84–89%) (Czaja i sur., 2004) i odsutnost drugih zagađujućih polimera, omogućujući jednostavan proces pročišćavanja (Sani i Dahman, 2009). Također, brojne hidroksilne skupine koje su dostupne u glukozi omogućuju uspostavljanje interakcija s preko 90% molekula vode, što rezultira velikim kapacitetom zadržavanja vode (Gelin i sur., 2007).

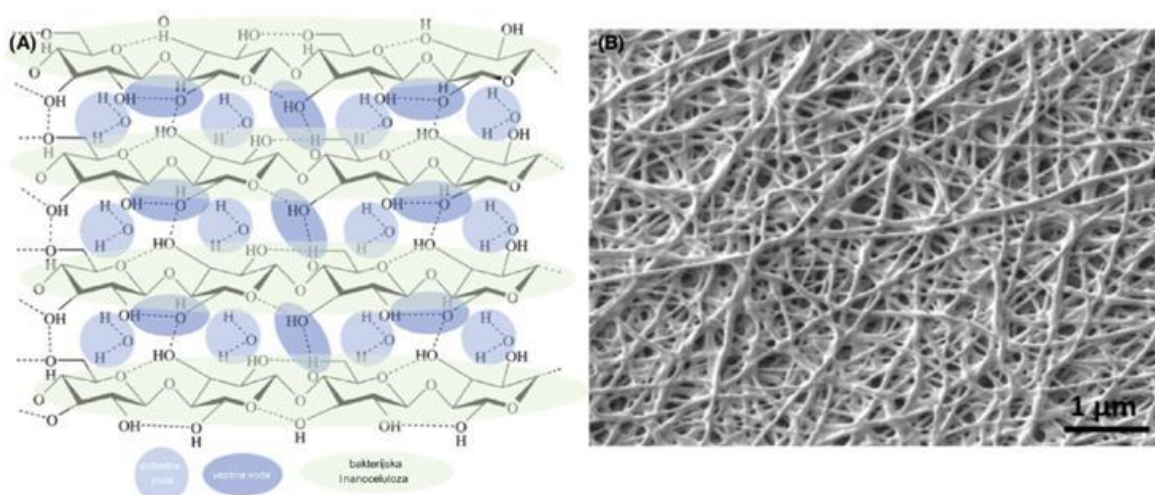
Usprkos prirodnim značajkama BNC polimera, fizikalna svojstva BNC jako ovise o uvjetima proizvodnje i obrade. Na primjer, za suhe uzorke BNC, utvrđeno je da obično, BNC predstavlja vlačnu čvrstoću od oko 240 MPa, Youngov modul od oko 10 GPa i maksimalno naprezanje u rasponu od 3%, premda se procjenjuje da modul pojedinog filameta BNC može biti čak i 114 GPa (Fernandes i sur., 2013). Prikazane vrijednosti objašnjavaju određenu disperziju između rezultata istraživanja, na primjer, za suhe uzorke BNC dobivena je vrijednost vlačne čvrstoće od 400 MPa i istezanja pri lomu 10% (Klemm i sur., 2005). Na hidratiziranim uzorcima BNC (98% udjela vode) od suho dobivenog materijala biofilma BNC, mehanička svojstva bila su u redoslijedu: vlačna čvrstoća 380 kPa, maksimalno naprezanje 21% i brzina prijenosa vodene pare od 2900 gm⁻²/dan (Fernandes i sur., 2017). Također, za ove uzorke određen je modul kompresije i pokazalo se da iznosi oko 0,06 MPa (Klemm i sur., 2001). Što se tiče morfoloških svojstava na hidratiziranim uzorcima, utvrđeno je da BNC ima specifičnu površinu od oko 60 m² g⁻¹, specifičan volumen pora od oko 0,2 cm³ g⁻¹ i prosječni promjer pora od oko 13 nm (Qiao i sur., 2015).

Opisana mehanička svojstva BNC, zajedno s biokompatibilnošću, netoksičnošću, sposobnošću oblikovanja, mekoćom i činjenicom da se sinteza BNC može prilagoditi optimizaciji ovih značajki i ugradnji sekundarnih komponenti, poput antibiotika u njezine pore, dokazuju postojanje osnovnih svojstava idealnih za primjenu kao zavoja za rane. U tom se smislu reološka karakterizacija čini vrijednim alatom za oblikovanje i optimizaciju BNC materijala, što omogućuje utvrđivanje odgovora pod utjecajem smičnog stresa (Rebelo i sur., 2018.), vremenski ovisnom reološkom ponašanju u takvim stanjima (Basu i sur., 2017) ili elastičnog karaktera BNC pri zadržavanju vode (Rebelo i sur., 2018).

2.6.2. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode

Neke od glavnih karakteristika potrebnih za zavoje, posebno za liječenje opekotina, su sadržaj vode i svojstvo zadržavanja vode, kako bi se rana održala hidriranom, kao i da bi mogla apsorbirati velike količine eksudata.

BNC ima složenu molekularnu strukturu, s molekulama vode povezanim vodikovim vezama. Vlakna BNC sastavljena su od linearnih lanaca glukanskih jedinica povezanih preko β -1,4 glikozidnih veza. Lanci glukana povezani su inter- i intramolekularnim vodikovim vezama, što omogućava BNC da bude mehanički robusna uz održavanje elastičnosti. Slobodna voda (bez veze) koja može prodrijeti i izaći iz molekularne strukture BNC odgovorna je za održavanje razine hidratacije koja je ključna za primjenu kod zavoja za rane (Slika 5).



Slika 5. Molekularna struktura BNC (A); SEM fotografija mrežne strukture vlakana BNC (B)

Pravilna kontrola vlage obično povećava stopu ozdravljenja, štiti ranu od infekcija, umanjuje bol i smanjuje globalne troškove zdravstva (Agarwal i sur., 2011). Nadalje, sposobnost apsorpcije i zadržavanja vode omogućuju nanošenje tekućih lijekova i bioaktivnih spojeva na zavoj (Shah i sur., 2013). Sposobnost održavanja vlažnosti također sprječava dehidraciju zavoja i sprječava da se on pričvrsti na ranu, time ujedno brani tkivo od izloženosti i umanjuje bol tijekom izmjene zavoja (Ovington, 2007).

Zna se da prisutnost eksudata uzrokuje odvajanje tkivnih slojeva rane, zbog čega proces ozdravljenja postaje sporiji. Stoga eksudate treba ukloniti iz rane (Hedlund, 2007), a dobra drenaža/odvodni kapacitet odlučujući je kriterij pri aplikaciji zavoja. Međutim, potrebno je osigurati da je rana hidrirana kako bi se proces zacjeljivanja odvijao na najbolji način, omogućujući da zavoj održava ravnotežu apsorpcije i oslobađanja tekućine (Davidson, 2015). S tim ciljem, svojstva zavoja s obzirom na sposobnost zadržavanja vode i sposobnost oslobađanja vode bila su predmet nekoliko istraživanja kako bi se karakterizirali novi BNC sustavi koji se mogu primijeniti kao zavoji za rane. Vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode (*eng.* Water Holding Capacity; WHC) i brzine ispuštanja vode (*eng.* Water Rate Release;

WRR) pojavljuju se kao kvantitativni fizički parametri za ovu procjenu, koji snažno ovise o fizikalno-kemijskim i strukturnim karakteristikama BNC sustava. Konkretno, poznato je da raspoloživa površina i raspodjela veličine pora, kao i prisutnost hidrofilnih aditiva u BNC sustavu uvode značajne promjene u vrijednostima WHC i WRR (Ul-Islam i sur., 2012a). Drugi indeks kvalitete zavoja za rane je brzina prijenosa vodene pare (*eng.* Water Vapour Transmission Rate; WVTR). Prekomjerno visok WVTR ubrzava dehidraciju i krastavost rane, dok prekomjerno nizak WVTR uzrokuje nakupljanje tekućina oko rane, smanjuje zacjeljivanje i povećava rizik od bakterijske kontaminacije. Poželjni WVTR je 2500-3000 gm²/dan (Li i sur., 2014a).

BNC kapacitet za zadržavanje vode ima vrijednosti od 60 do 700 puta veće od njene suhe mase, ovisno o uvjetima sinteze. U tipično statično uzgojenim pelikulama BNC predstavlja otprilike 1% ukupne mase, a ostatak je voda (Okiyama i sur., 1992). Moguće objašnjenje za tako visoku razinu hidrofilnosti povezuje se s činjenicom da se povezivanje celuloznih vrpca događa izvan stanice, u tekućoj hranjivoj podlozi, a zatim nastaju brojne micelle koje nakupljaju velike količine tekućine. Nadalje, hidrofilnost BNC pelikula dijelom proizlazi iz široke unutarnje površine intersticijskog prostora vlažne strukture. U stvari, BNC nakon sušenja pokazuje lošu rehidraciju zbog visoke kristaliničnosti, ograničavajući njezinu primjenu kao materijala za zavoj (Huang i sur., 2010). Da bi se to poboljšalo, provedene su različite strategije koje mijenjaju strukturu BNC s ciljem povećanja kapaciteta zadržavanja, odnosno otpuštanja vode.

2.6.3. Veličina pora i morfologija vlakana

WHC sposobnost BNC je izravno povezana s raspoloživom količinom pora i površinom umreženih vlakana. Kompaktnija struktura BNC, koju predstavljaju gušće raspoređena vlakna sa smanjenim volumenom pora i površine (Wang i sur., 2012), rezultira nižim vrijednostima WHC. U takvom vlaknu smanjuje se raspoloživi prostor i broj mjesta za vezanje molekula vode. S druge strane, kompaktnija BNC struktura povezana je s nižim vrijednostima WRR. Gušća mikrovlakna rezultiraju većom količinom zadržane vode u sustavu zbog stvaranja većeg broja vodikovih veza i manjom količinom slobodne vode (Gelin i sur., 2007), što sprječava isparavanje vode. Poznavanje ovih suprotnih učinaka povezanih sa strukturom BNC i sposobnosti zadržavanja i otpuštanja vode, mogućnost pristupa i prilagodbe strukturnih parametara BNC tijekom procesa biosinteze ili post-sintetskih modifikacija, bila je u fokusu nekoliko istraživanja tijekom posljednjeg desetljeća. Izmjena fermentacijskih postavki, poput uvjeta rasta kulture, sastava hranjive podloge i prisutnosti

specifičnih aditiva u sintetskom procesu BNC-a, uzrokuje promjene u strukturnim svojstvima, naročito u kristaliničnosti i morfologiji vlakana (Sulaeva i sur., 2015).

Istraživanja sposobnosti zadržavanja vode o strukturnim karakteristikama pokazala su da smanjenje veličine pora i površine, dobiveno modifikacijom BNC rezultira smanjenjem WHC i povećanjem WRR (Ul-Islam i sur., 2012a). Kompaktnija struktura BNC sa smanjenom poroznošću dobivena je sintetskim postupkom dodatkom hidroksipropil metilceluloze (HPMC), što je rezultiralo smanjenom vrijednosti WHC (Huang i sur., 2011). Nasuprot tome, BNC strukture s povećanom poroznošću pokazale su veću vrijednost WHC. Sintezom BNC u prisutnosti karboksimetilceluloze (CMC) u hranjivoj podlozi, dobivena je mreža sa širim vrpčama, zbog adhezije CMC na površinu BNC vlakna, a time i s većim WHC (Chen i sur., 2016). Povećana raspodjela veličine pora također je uočena u BNC strukturi s opuštenijim vlaknastim rasporedom (Grande i sur., 2009), što je rezultiralo većom vrijednosti WHC (Yu i sur., 2011).

Veća poroznost, a samim tim i povećana sposobnost zadržavanja i otpuštanja vode, također se mogu postići i post-sintetskim modifikacijama BNC. Visoko porozna BNC struktura koja je sposobna apsorbirati najmanje sedam puta više vode nego čista BNC rezultat je korištenja sredstava za pjenjenje (Yin i sur., 2012). Paximada i sur. su uočili da kratki ultrazvučni predtretmani (1 min) primijenjeni na vodene suspenzije BNC induciraju raspad vlakana, što je rezultiralo porastom WHC, zajedno s viskozitetom i čvrstim karakterom uzoraka (Paximada i sur., 2016).

Mehanička i elektrokemijska svojstva BNC proučavana su pri različitim udjelima vode (100%, 80% i 50%), za koje su uočeni progresivni očvršćujući i sve jači otpori, koji su se smanjivali nakon djelomične dehidracije. Razvijen je i primijenjen teorijski model predviđanja gubitka vode BNC, koji omogućava razumijevanje strukturnih promjena koje su vidljive kod suhe BNC biomase (Rebelo i sur., 2018).

2.7. Kompoziti BNC

Kompozit je materijal koji se sastoji od najmanje dva različita materijala, s jasnim prostorom između njih, a djeluje komplementarno prema svojstvima svojih sastojaka. Cilj proizvodnje kompozitnih materijala obično je pružiti osnovnom materijalu svojstva (od reaktiviranja) koja sam ne posjeduje, a koja su potrebna za određenu primjenu. U većini slučajeva ta se svojstva ne mogu postići samom osnovnom komponentom. Faza pojačanja koja se može sastojati od vlakana (Lazarini i sur., 2016), čestica (Galateanu i sur., 2015), listova (slojeva) (Foong i sur., 2018), međuovisnih mreža (Lin i sur., 2014) ili stanica, raspršuje se u takozvanoj matrici ili kontinuiranoj fazi (obično ona koja ima veći postotak). Svojstva kompozita ovise i o prirodi upotrijebljenih materijala i stupnju njihove veze između graničnog

prostora. Za proizvodnju kompozita mogu se koristiti sve vrste materijala od polimera do keramike ili metala.

BNC je privukla pažnju u medicini, zbog svojih svojstava, hidrofiliteta, vrlo visoke čistoće, poroznosti, biokompatibilnosti i budući da također pokazuje mrežnu strukturu, mogućnosti kontroliranog oslobađanja lijekova. Da bi poboljšale njenu učinkovitost kao zavoja ili da bi joj osigurale prilagođena svojstva ili funkcionalnost, strategije su se oslanjale na iskorištavanje njenih prirodnih svojstava i poboljšanja kao u slučaju vlažne čvrstoće, biokompatibilnosti te između ostalog i zadržavanja vode. Ipak, sama BNC ne pokazuje nekoliko poželjnih karakteristika, poput antibakterijskog djelovanja ili protuupalnih svojstava. Na taj su način, pored poboljšanja prirodnih obilježja, u BNC ugrađena nova svojstva, uglavnom razvojem BNC kompozita (Slika 6).



Slika 6. Glavna poboljšanja BNC za primjenu kao zavoja. Svjetloplava - svojstva BNC-a koja predstavljaju prednosti u primjeni kao zavoja. Tamnoplava - svojstva BNC koja su poboljšavana. Zelena - dodatna svojstva koja su uvedena u BNC za poboljšanje zarastanja rana.

Općenito, smanjenje veličine pora može se postići dodavanjem sekundarne komponente u mrežu BNC vlakana, što dovodi do punjenja pora. Ipak, na WHC i WRR može utjecati priroda same sekundarne komponente. U Tablici 1. predstavljen je sažetak primjera kompozita BNC u kojima pojačanje zadovoljava funkciju koja se treba poboljšati za primjenu kao zavoj.

Tablica 1. Primjeri BNC kompozita i poboljšanih svojstava

BNC kompozit	Poboljšana svojstva	Literatura
polivinil alkohol (PVA)	mehanička	Castro i sur., (2015); Qiao i sur., (2015)
dehidrogenativni polimer koniferilnog alkohola (DHP)	antibakterijska aktivnost	Zmejkoski i sur., (2018)
nanočestice srebra	antibakterijska aktivnost	Volova i sur., (2018); Tabai i Emtiazi (2018); Shao i sur., (2016a,b); Wen i sur., (2015); Wu i sur. (2018); Pal i sur., (2017)
hitozan i alginat	veća elongacija, rehidracija, koeficijent bujanja i prijenos vodene pare	Chang i Chen (2016)
hijaluronan	termalna stabilnost, niža ukupna površina i volumen pora, gubitak mase i elongacija pri pucanju	Li i sur., (2014a,b; 2015)
akrilna kislina	potiče brže zacjeljivanje rana, poboljšana epitelizacija i ubrzana proliferacija fibroplasta	Mohamad i sur., (2014a,b)
činkov oksid (ZnO)	antibakterijska aktivnost	Janpetch i sur., (2016)
arginin	potiče proliferaciju, migraciju i ekspresiju kolagena-I u fibroblastu i endotelnim stanicama	Qiao i sur., (2016)
antibiotici	antibakterijska aktivnost	Volova i sur., (2018); Shao i sur., (2016a,b); Lazarini i sur., (2016)
magnetske nanočestice (magnetit)	učinkovitost zacjeljivanja kroničnih rana	Galateanu i sur., (2015)
agaroza	mehanička svojstva i upijanje vode	Awadhiya i sur., (2017)
titanijev dioksid (TiO ₂) nanočestice	potiče zacjeljivanje i regeneraciju tkiva	Khalid i sur., (2017); Khan i sur., (2015)
C ₆₀ nanočestice	terapija za rak kože	Chu i sur., (2018)
polilaktična kiselina	mehanička	Foong i sur., (2018)
dvosloj BNC s različitim gustoćama vlakana	kontrolirano otpuštanje različitih antibiotika za liječenje kožnih infekcija	Lazarini i sur., (2016)
nanočestice zlata	poboljšanje antibakterijske učinkovitosti	Li i sur., (2017a,b)
montmorilonit i nanočestice srebra	antibakterijska učinkovitost	Li i sur., (2017a,b)
grafen oksid/srebro nanohibrid	antibakterijska učinkovitost	Mohammadnejad i sur., (2018)
natrijev alginat(SA)	mehanička	Lin i sur., (2014)
plastifikatori (PEG i glicerol)	fizikalno-kemijska	Sun i sur., (2018)
hidrolizirani želatinski peptid	fizikalno-kemijska	Lin i sur., (2015a,b)
hitozan	fizikalno-kemijska i antibakterijska	Savitskaya i sur., (2017); Zhang i sur., (2016)

Prisutnost visoko hidrofilnog hitozana potiče apsorpciju većih količina vode u BNC/hitozanskim kompozitima, u usporedbi s nativnom BNC, iako sa smanjenom poroznošću. WHC je povišen zbog sposobnosti molekula hitozana da istodobno uspostave vodikove veze s BNC vlaknima i molekulama vode. Istovremeno, raste WRR zbog smanjene poroznosti. Ovi rezultati naglašavaju važnost izbora aditiva u usmjeravanju karakteristika BNC ovisno o željenim karakteristikama zavoja. (Ul-Islam i sur., 2012a).

Phiselaphong i Jatupaiboon (2008) i Phisalaphong i sur. (2008) opisali su veći kapacitet apsorpcije vode BNC/hitozanskih filmova s povećanim sadržajem hitozana. Primijećeno je da i hitozanska molarna masa utječe na WHC, gdje je veći WHC povezan s većom molarnom masom. Još kompaktniju strukturu BNC/hitozanskih filmova s manjom veličinom pora opisali su Lin i sur. (2013). U njihovim istraživanjima, WHC i WRR nisu pokazali značajnu razliku u usporedbi modificiranih uzoraka s čistom BNC, premda su zavoji dobiveni od modificirane BNC pružali bolju vlažnost za rane s malim i srednjim količinama eksudata.

Također je zabilježen utjecaj ostalih visoko hidrofilnih spojeva na WHC i WRR. Uključivanje alginata u strukturu BNC-a prouzročilo je nanoporoznu strukturu i smanjenje promjera pora, ali primijećeno je povećanje sposobnosti upijanja vode (Phisalaphong i sur., 2008). Povećani WHC opažen u takvim BNC/alginatnim filmovima istraživali su Chiaoprakobkij i sur. (2011) koji su uočili gubitke vodikovih veza između celuloznih vlakana u smjesi s drugom komponentom. Zaključili su da je veća sposobnost unosa vode koja se primjećuje kod suhih spužvi bolja potpora adsorpciji eksudata (Chiaoprakobkij i sur., 2011).

Aloe vera gel se također pojavio kao povoljna komponenta koja treba biti sastavni dio zavoja za rane. Kada je uključen u strukturu BNC tijekom procesa biosinteze, s udjelom gela manjim od 30%, gel aloe vere povećao je WHC za oko 1,5 puta u odnosu na nedomificirani materijal. Nadalje, dodatkom aloe vera gela/BNC kompozit, uočeno je poboljšano isparavanje (Saibuatong i Phisalaphong, 2010).

Nedavno su Chang i Chen (2016) okarakterizirali fizikalna svojstva HOBC/hitozan/alginatnih filmova za zavoje. WVTR BNC filmova pripremljenih korištenjem gel otopina od 98,0% i 98,5% sadržaja vode iznosio je 2865, odnosno 3034 g m⁻²/danu, i bio je blizu idealnom zavojju. Međutim, niža fluidnost otopine gela s 98,0% sadržaja vode nije bila povoljna za oblikovanje. Gelnja otopina s 98,5% sadržaja vode pokazala je najpoželjnije mehaničke osobine, hidrofilnost i WVTR.

Kompoziti BNC i hidrofilne komponente pokazali su slična svojstva sustavima BNC/hitosan, BNC/alginat i BNC/aloe vera gel, pokazujući mogućnosti prilagodbe WCH i WRR tijekom pripreme smjese/kompozita i proizvodnje zavoja s medicinski učinkovitim karakteristikama.

Istraživani su i drugi mogući sustavi hidrofilnih sintetičkih polimera za proizvodnju BNC kompozita za zavoje. Primjerice, uočeno je da BNC modificirana s glicerinom, koji se koristi kao plastifikator, stvorila odličan učinak vlaženja kože. Dobra biokompatibilnost i povećana savitljivost, odnosno prilagodljivost, sugerirali su uporabu ovog materijala u liječenju suhih rana, poput onih koje se pojavljuju zbog psorijaze i atopijskog dermatitisa (Almeida i sur., 2014).

Sposobnost apsorpcije tekućine u BNC može se značajno izmijeniti dodavanjem hidrofilnih sintetičkih polimera, pripremljenih kao membrana za anionsku izmjenu, poput poli-AEM. BNC/poli-AEM kompoziti pokazali su povećanu sposobnost bubrenja, sa 100% na 6200%, u usporedbi s nemodificiranom BNC i kompozitnim materijalom. Takva učinkovitost bubrenja rezultat je konjugacije hidrofilnih svojstava sintetske komponente zajedno s njezinim kapacitetom da spriječi razaranje BNC strukture tijekom procesa sušenja (Figueiredo i sur., 2015).

BNC/akrilni hidrogeli također su pokazali veliko poboljšanje u omjeru bubrenja od 4000 do 6000%. Ti su rezultati primijećeni u *in vivo* eksperimentima, u kojima je upotreba BNC kompozita potvrdila promicanje zacjeljivanja opekline s pojačanom epitelizacijom i proliferacijom fibroblasta (Mohamad i sur., 2014). Takvi BNC kompoziti smatraju se obećavajućim materijalom za oblaganje opekotina.

Chang i Chen (2016), nakon tretiranja BNC-a vodikovim peroksidom, proizveli su hitozan i alginat BNC kompozit, koji nije samo pokazao poželjna mehanička svojstva, već je pokazao i svojstva rehidracije koja su omogućila uporabu ovih kompozita kao materijala za zavoje za apsorpciju eksudata i za ravnomjerno kontrolirano otpuštanje lijeka. Još jedan kompozit hitozana predložili su Savitskaya i sur. (2017) tako što su modificirali BNC imobilizacijom hitozana, što rezultira kompozitnim materijalom koji sadrži glukozamin i N-acetilglukozamine integrirane u celulozni lanac. Ovi kompoziti pokazali su poželjna svojstva kao što su dobra mehanička svojstva, svojstvo zadržavanja vlage i visoko antibakterijsko djelovanje protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Ove osobine čine BNC/hitozan kompozite kandidatom ne samo kao sredstva za zavoje, već i za proizvodnju tkiva (Savitskaya i sur., 2017).

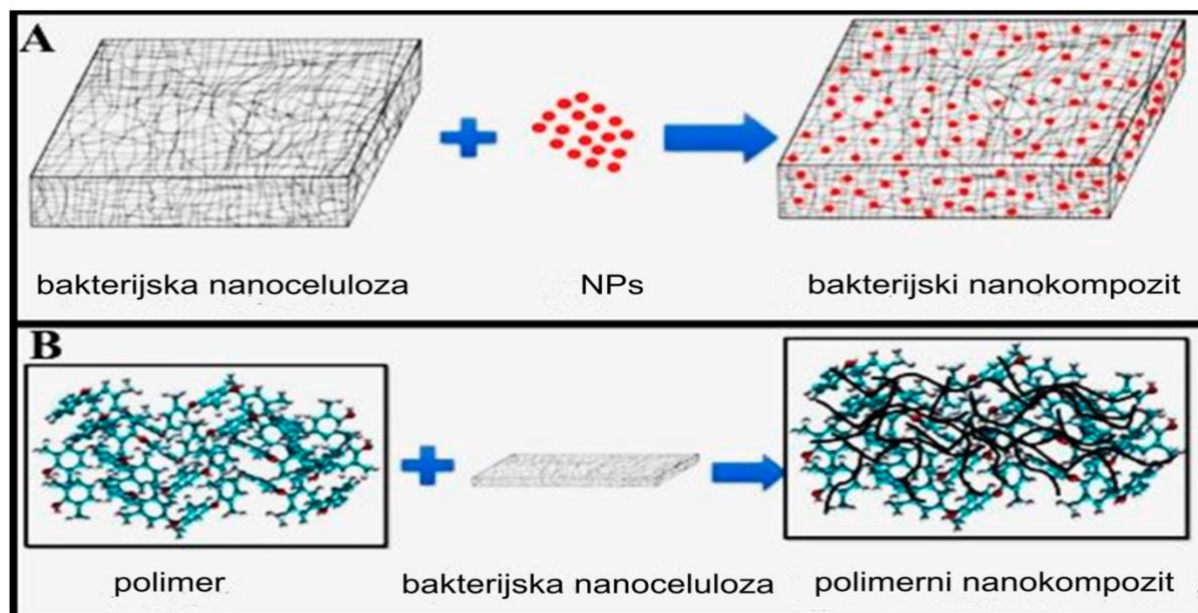
Mohamad i sur. (2014) razvili su i karakterizirali hidrokele BNC/akrilne kiseline sa svrhom poboljšanja potencijala BNC kod zacjeljivanja rana. Ovi kompoziti predstavljaju makroporoznu mrežnu strukturu koja ima visok omjer bubrenja i visoku brzinu prijenosa vodene pare što su važna svojstva u pogledu apsorpcije eksudata i pružaju hidraciju za zacjeljivanje rana, posebno opekotina (Mohamad i sur., 2014). Otpuštajući različite količine

nanočestica magnetita tijekom procesa biosinteze, BNC kompoziti dobiveni su izravno iz BNC kulture. Dokazano je da postojanje nanočestica magnetita tijekom procesa biosinteze ne ometa samu biosintezu. Koristeći ovu tehniku i proizvodeći zavoje za rane od kompozita BNC/magnetita, bilo je moguće poboljšati fizička, kemijska, morfološka i biološka svojstva čiste BNC (Galateanu i sur., 2015). Osim antibakterijskog djelovanja, nanočestice srebra pokazale su povećanje fizikalnih svojstava čiste BNC. Nanočestice srebra mogu se sintetizirati unutar porozne trodimenzionalne BNC strukture; ta se mreža zatim zrači UV svjetlom tako da se nanočestice srebra fotokemijski talože na BNC hidrogel. Nanočestice srebra ostaju kemijski vezane na površini celuloznih vlakana, budući da se složene pelikule čuvaju u vlažnom okruženju, zacjeljivanje rana je učinkovitije (Pal i sur., 2017). Agaroz je biorazgradiv polimer s ograničenom mehaničkom robusnošću i prekomjernim nakupljanjem vode. Ova svojstva ograničavaju njenu uporabu kao zavoja, ali ako se koristi u smjesi s npr. BNC, mogu se postići vrlo zanimljiva svojstva. Kompoziti BNC/agaroze pokazali su dobra mehanička i svojstva bubrenja, termičku stabilnost i biorazgradivost, što ih čini prikladnim kao materijal za zavoje (Awadhiya i sur., 2017). Kao materijal za obloge predložena je polimljična kiselina (eng. Poly Lactic Acid; PLA) u koncentraciji ispod 10%. Foong i sur. (2018) pokazali su da ugradnja 8% PLA na BNC čini smjesu prikladnijom za uporabu u obliku zavoja s antimikrobnim svojstvima. Koristeći BNC/PLA smjesu, mogu su poboljšati mehanička svojstva održavajući razumno vrijeme vlaženja. Također, zadržavaju poželjnu površinsku morfologiju na mikroskopskoj razini (morfologija PLA obloga je vlaknastija i poroznija) s malim unosom vlage i produljenim bubrenjem u simuliranom okruženju (Foong i sur., 2018). Alginat je biomaterijal koji se već primjenjivao u medicini zbog svojih profitabilnih svojstava, poput biokompatibilnosti i lakoće geliranja. Lin i sur. (2014) predstavili su BNC/natrijev alginat (SA) kompozit koji ima mrežnu strukturu polimera. Ovaj kompozit pokazao je izvanredne omjere otpuštanja, modul zatezanja, vlačnu čvrstoću i istezanje u odnosu na čistu BNC. Ova studija potvrdila je da struktura radikalno mijenja sposobnost otpuštanja i mehanička svojstva kompozita i predstavlja ga kao obećavajućeg kandidata za primjenu u medicini kao zavoja za rane i inženjering kože (Lin i sur., 2014). Poznato je da suha BNC ima lošu propusnost plina i apsorpciju vode. Kako bi poboljšali fizikalno-kemijska svojstva suhe BNC, Sun i sur. (2018) proveli su komparativna istraživanja koristeći dva biokompatibilna plastifikatora s različitim molekularnom masom i sadržajem hidroksila, glicerola (G) i polietilen glikola (PEG). Pokazali su da glicerol i PEG ne samo da prekrivaju mikrovlakna BNC, nego i proširuju slobodni prostor među vlaknima, stvarajući visoko poroznu strukturu. Čvrstoća smjese je značajno povećana u usporedbi s čistom BNC-om, a sposobnost apsorpiranja/zadržavanja vode smjese BNC-a bila je znatno veća od suhe BNC. Nadalje, visoko porozna struktura formirana plastificiranim suhim BNC kompozitima

pospješila je prijenos vodene pare. Plastificirani suhi BNC kompoziti također su pokazali i izvrsno antibakterijsko djelovanje (Sun i sur., 2018).

2.7.1. Priprava BNC kompozita

U literaturi postoje brojni radovi koji uključuju proizvodnju nanoceluloznih kompozitnih materijala. Hutchens i sur. (2006) objavili su rezultate istraživanja koje uključuje upotrebu kompozitne BNC kao biomaterijala. Inkubirali su bakterijsku nanocelulozu u otopini natrijevog hidrogen fosfata i kalcijevog klorida u lateksu. Rendgenska difrakcija potvrdila je ugradnju kalcija i fosfata u BNC. Nanoceluloza se koristi i kao materijal za pojačanje i kao matrica (Slika 6) (Ifuku i sur., 2007). Čisto postavljena vlaknasta mrežna struktura celuloze može se smjestiti u nanopolimere (NP) i djeluje kao matrica (Ul-Islam i sur., 2012 a,b). Slično tome, celulozna nanovlakna mogu pojačati druge polimerne i nepolimerne materijale, poput stanica i tkiva (Svensson i sur., 2005). Bakterijska nanoceluloza pokazala je vrlo obećavajuće karakteristike zbog svoje uporabe kao armaturnog materijala za kompozite s optičkim funkcijama. Nedavno je jedna studija pokazala da su formirane karakteristike kompozita, poput transparentnosti i nizak koeficijent ekspanzije, prvenstveno posljedica mreža lanaca polukristaličnih materijala nanovlakana proizvedenih bakterijom *K. xylinus* (Yano i sur., 2005). Ifuku i sur. (2007) zadržali su acetilirane BNC listove za poboljšanje svojstava optički transparentnih kompozita akrilne smole ojačane s nanovlaknima.



Slika 6. BNC kao matrica(A) i pojačanje (B) za pripravu nanokompozita (Ifuku i sur., 2007)

2.8. Optimizacija bioloških svojstava i antibakterijske aktivnosti

Iako ima izvanredna fizička i kemijska svojstva, kao pokrov za previjanje rana, izvorne karakteristike BNC nisu dovoljne za zadovoljavanje trenutnih potreba na tržištu materijala za zavoje. U današnje vrijeme se od zavoja očekuje da ima funkcionalni doprinos u procesu ozdravljenja. Glavne komplikacije koje često nastaju uključuju kontaminaciju oportunističkim patogenima i kasniji razvoj infekcije i upale, kao i razvoj tumora koji doprinose razvoju kroničnih rana (Fonder i sur., 2008).

Brz razvoj rezistencije na antibiotike među velikim brojem bakterijskih patogenih vrsta (Svjetska zdravstvena organizacija, 2015) predstavlja dodatni problem pacijentima s kroničnim ili teškim opeklinama koji se često i više puta hospitaliziraju. Otvorene rane pogodne su za naseljavanje sojevima otpornim na više lijekova. Bakterijske infekcije su u stvari najčešća klinička komplikacija, obično povezana sa stanjem kože i imaju glavnu ulogu u uspješnosti liječenja ili kašnjenju procesa ozdravljenja, uzrokujući nevolje i financijske poteškoće pacijenta. Kolonizacija bakterijama posebno je kritična kod opekotina, jer ti pacijenti obično imaju oslabljen imunološki sustav i širi poremećaj kožne barijere (Calum i sur., 2009).

Iako BNC pruža fizičku barijeru koja smanjuje prodiranje bakterija u tkiva, u svom prirodnom obliku ona sama po sebi ne pokazuje antimikrobna svojstva (Czaja i sur., 2006). Da bi se poboljšala njena učinkovitost kao terapijsko sredstvo za liječenje ili u profilaktičke svrhe, u strukturu BNC-a uvedene su modifikacije ili su dodani specifični spojevi kako bi se dobile različite biološke aktivnosti, poput antimikrobnih ili protuupalnih.

Nedavno su prihvaćeni različiti pristupi za razvoj aktualnih funkcionalnih zavoja za rane s promijenjenim sastavom. Spojevi za koje je opisano da su ugrađeni u BNC, u fazi razvoja ili pretkliničkih ispitivanja, uključuju ne samo male molekule, već i makromolekule i složene polimere. Do sada su korištene tri glavne strategije ugradnje spojeva: zasićenjem nakon sinteze, kemijskim modifikacijama pročišćene strukture BNC ili primjenom genetskog inženjerstva. Izbor strategije ugradnje ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama aktivnog spoja, kao što su molekularna veličina, topljivost, stabilnost i radna koncentracija, o vrsti BNC mreže, poput prirodne vlažne, polusuhe ili smrznute, a također i o soju bakterija koji se koristi kao proizvođač. Metoda funkcionalizacije utječe na brzinu otpuštanja spoja.

Spojevi dobiveni od lignina mogu se upotrijebiti kao antibakterijsko pojačanje u BNC kompozitima čime se poboljšava antibakterijsko djelovanje zavoja za rane. Zmejkoski i sur. (2018) koristili su polimer ligninskog modela (dehidrogenativni polimer koniferilnog alkohola) za proizvodnju BNC smjesa hidrogela koje karakterizira smanjenje broja i veličine pora, a

zahvaljujući antimikrobnom djelovanju, brže obnavljaju kožu te je smanjena bol kod pacijenata. Također, posljednjih godina, zbog novonastale prijetnje otpornosti bakterija na antibiotike, alternative poput kompozita nanočestica srebra privukle su znanstvenu pažnju. Može se upotrijebiti nekoliko vrsta nanočestica srebra kao što je srebrni sulfadiazin (Shao i sur., 2016b) ili na primjer srebrni nitrat (Wu i sur., 2018). Ovi kompoziti pokazali su izvrsne antibakterijske učinke na najčešće ljudske patogene održavajući dobru biokompatibilnost (Wu i sur., 2018). Dokazano je da su kompoziti BNC/ nanočestica srebra netoksični i pokazuju dobru biokompatibilnost na mononuklearnim stanicama periferne krvi zbog kontroliranog oslobađanja iona srebra (Tabaai i Emtiazi, 2018). Te smjese/kompoziti, koje sadrže nanočestice srebra, prozirne su, omogućujući neprekidnu vizualizaciju rane bez uklanjanja zavoja (Tabaai i Emtiazi, 2018). Usporedna studija provedena na modelima štakora pokazala je da rane liječene BNC-om s nanočesticama srebra pokazuju veću brzinu zarastanja u usporedbi s čistom BNC-om, dokazujući da su ti kompoziti vrlo obećavajući kao zavoji za opekline (Wen i sur., 2015). Volova i sur. (2018) testirali su u istu svrhu upotrebu nanočestica srebra i antibiotika (amikacin i ceftriakson), postićući snažan inhibitorski učinak na patogene, pritom ne ometajući rast epidermalnih stanica. Drugi kompoziti testirani su na temelju antibiotika, poput tetraciklina za poboljšanje antibakterijske aktivnosti (Shao i sur., 2016a). Lazarini i sur. (2016) naveli su da BNC proizvedena u svim hranjivim podlogama prikazuje unutarnji kompozit formiran s dvostrukim slojem (s različitom gustoćom vlakana) i trodimenzionalnom mrežom vlakana postignutim u samo jednom koraku. Ova 3D mrežna struktura dvosloja sa ispreplitanjem vlakana visoke gustoće, proizvedena u hranjivoj podlozi od melase šećerne trske, odgovorna je za najveći kapacitet zadržavanja i kontinuirano oslobađanje antibiotika poput ceftriaksona, koji se primjenjuju u slučaju prisutnosti bakterije *Staphylococcus aureus* (Lazarini i sur., 2016). Kompoziti nanočestica zlata i BNC pokazuju bolju učinkovitost od većine antibiotika na gram-negativne bakterije, zadržavajući izvanredna fizikalno-kemijska svojstva kao što su kapacitet unosa vode, visoko mehaničko naprezanje i biokompatibilnost. Široki antibakterijski spektar ovih kompozita, uz poželjno zadržavanje vlage i dobra mehanička svojstva, pokazali su da su izvrstan materijal za zavoje (Li i sur., 2017b). Nanočestice TiO₂ poznate su po svojoj superhidrofilnoj kemijskoj stabilnosti i biokompatibilnosti (Fujishima i sur., 2000). *In vivo* djelotvornost kompozita BNC/TiO₂ procijenjena je na modelu opekotina mjerenjem promjene područja rane, postotka kontrakcije i histopatologije. Rezultati su pokazali da su kompoziti BNC/TiO₂ pokazali izvanredan potencijal ozdravljenja, što je omogućilo brži stupanj ponovne epitelizacije, kao i poboljšanu sposobnost kontrakcije rana (Khalid i sur., 2017). Pored antibakterijskih svojstava, Khan i sur. (2015) pokazali su da BNC/TiO₂ kompoziti pokazuju izvanredne sposobnosti adhezije i proliferacije stanica na stanicama životinjskih fibroblasta, ne

pokazujući toksične učinke. Janpetch i sur. (2016) proučavali su BNC/cinkov oksid kompozite za pojačavanje antimikrobne aktivnosti. Cinkov oksid (ZnO) poznat je kao anorgansko antibakterijsko sredstvo, a BNC se pokazao kao izvrstan predložak za koordinaciju sa ZnO. Pokazali su da je sadržaj ZnO u tim kompozitima odlučujući za poboljšanje dezinfekcijskog učinka BNC (Janpetch i sur., 2016). Qiao i sur. (2018) proučavali su BNC/arginin kompozite nakon oksidacije BNC novom tehnikom. Visoki stupanj oksidacije BNC povećava količinu aldehida, što smanjuje staničnu biokompatibilnost BNC. Koristeći ovu novu metodu za oksidaciju BNC i stvaranje argininskih kompozita, povećali su hrapavost i površinsku energiju BNC i bili u stanju potaknuti razmnožavanje, migraciju i ekspresiju kolagena-I, fibroblasta i endotelnih stanica (Qiao i sur., 2018). Koristeći fotodinamičku terapiju, BNC/C60 može se koristiti kao obloga za rane za liječenje raka kože. Čestice C60, homogeno raspoređene u 3D mreži BNC, pokazale su veliku sposobnost stvaranja reaktivnih vrsta kisika prilikom izlaganja svjetlosti čime inhibiraju rast nekoliko bakterija. BNC/C60 kompoziti pokazali su malu citotoksičnost u mraku; međutim, pokazali su značajno uništavanje stanica kada su izloženi vidljivoj svjetlosti (Chu i sur., 2018). Li i sur. (2017a) pokazali su da nanočestice srebra manje veličine, ravnomjerno imobilizirane u montmorilonitima, što je dovelo do BNC kompozita, pokazuju visoku antimikrobnu aktivnost. Osim posjedovanja poželjnih mehaničkih i hidrofilnih svojstava, ovi kompoziti su pokazali i slabo otpuštanje srebra. Iako je omjer oslobađanja srebra bio kratak, mala veličina nanočestica srebra omogućila im je učinkovitiju penetraciju bakterijskih stanica i posjedovanje visokog elektrostatičkog afiniteta za međusobno povezivanje sa staničnom membranom kako bi ometali rast bakterija (Li i sur., 2017a). Grafen oksid – srebrov nanohidbrid korišten je za dobivanje antibakterijske aktivnosti BNC proizvodnjom BNC/grafen oksid–srebrovog nanohidridnog kompozita. Mohammadnejad i sur. (2018) pokazali su da prisutnost grafen oksida–srebrovog nanohidrida povećava mehaničku čvrstoću i antibakterijsko djelovanje BNC.

Hijaluronan, glikozaminoglikan prisutan u sinovijalnoj tekućini koja obavija zglobove, hrskavicu i tkiva, omogućuje vezanje velikog broja molekula vode, poboljšavajući hidrataciju tkiva. Također, njegova reološka svojstva povećavaju viskoznost tekućine, pružajući otpornost tkiva na mehanička oštećenja. Hijaluronan je poznat po svojim ljekovitim karakteristikama, povezanima s pro-angiogenim i anti-apoptotičkim svojstvima, podupirući oporavak ranog kožnog tkiva i smanjenje stvaranja ožiljaka (Li i sur., 2015). Ovisno o molekularnoj veličini, on može imati protuupalno i imunosupresivno djelovanje - hijaluronan visoke molekulske mase ili imati protuupalno djelovanje - hijaluronan s niskomolekularnom masom (Litwiniuk i sur., 2016). Ustvari, tijekom procesa popravljanja kože, naglo povećanje hijaluronana povezano je s oticanjem tkiva, migracijom i proliferacijom epitelnih i mezenhimalnih stanica te indukcijom signala citokina. Hijaluronan koji se proteže od

stanične površine do struktura zvanih kablovi može zarobiti leukocite i trombocite i promijeniti njihovu funkciju, modulirajući upalu. Li i sur. (2014a) proučavali su fizikalna svojstva kompozita BNC koji sadrže hijaluronan visoke molekulske mase kao poticaj na proces ozdravljenja. Ovi BNC kompoziti pokazali su poboljšana svojstva u pogledu toplinske stabilnosti, manje ukupne površine i volumena pora, gubitka težine i izduženja pri prijelomu (Li i sur., 2014a).

Lidokain, koji se koristi kao lokalni anestetik, i ibuprofen, nesteroidni protuupalni lijek, odabrani su kao modeli hidrofilnih i hidrofobnih spojeva, za razvoj toplinskih BNC sustava za vremensko otpuštanje lijekova. Dok se vodena otopina lidokaina koristila za natapanje prethodno isušenih BNC membrana, u slučaju ibuprofena, voda BNC membrane prethodno je zamijenjena etanolom. Nakon toga, ove prethodno obrađene membrane uronjene su u alkoholnu otopinu ibuprofena. Difuzijski testovi pokazali su nižu brzinu otpuštanja lidokaina, ali 3 puta veću stopu oslobađanja ibuprofena, nego u komercijalnim zavojima (Trovatti i sur., 2012). U novije vrijeme punjenje diklofenakom, nesteroidnim protuupalnim spojem, koji se često koristi za ublažavanje boli i upale u kratkoročnim kliničkim situacijama, izvedeno je potapanjem isušenih membrana BNC u otopinu diklofenaka s 5% glicerola kao plastifikatora. Membrane BNC-diklofenaka pokazale su znatno sporiju brzinu otpuštanja od komercijalnih gelova, sugerirajući BNC membrane kao povoljne transdermalne sustave za oslobađanje diklofenaka (Silva i sur., 2014).

Kvaterni amonijevi spojevi (QAC) su biocidi male molekulske mase koji imaju pozitivan naboj i hidrofobni segment. Oni imaju visoku sposobnost prodiranja u stanične membrane, nisku toksičnost i antibakterijsko djelovanje, ovisno o dužini alkilnog lanca. Nedavno je sintetiziran QAC reakcijom spajanja između C18 dugolančane nezasićene masne kiseline, dimera dilinoleinske kiseline (DLA), tirozina i pozitivno nabijenog etilendiamina (Umeda i sur., 1999). Rezultirajući spoj [EDA] - [DLA-Tyr] punjen je uranjanjem 24 sata na membrane BNC i pokazao je antimikrobno djelovanje protiv *S. aureus* i *S. epidermidis*, oba oportunistička patogena koja su visoko povezana s infekcijama kože i rana, posebno u bolničkim slučajevima.

Što se tiče imobilizacije enzima, obavezan je izbor pogodnog nosača. Iako se većina nosača mora aktivirati prije imobilizacije, što rezultira krajnjom niskom učinkovitošću, BNC membrana se može puniti jednostavnim namakanjem, a da to ne utječe na pravilno savijanje strukture enzima. Ugradnja proteina u membranu BNC za razvoj sustava prijenosa istraživana je korištenjem proteinskih modela, kao što je albuminski serum. Nanošenje je optimizirano korištenjem nikad osušene, prethodno nabubrene BNC membrane, koja je nastala zbog promjena mreže vlakana tijekom procesa liofilizacije, a biološka aktivnost proteina održavana je tijekom koraka nanošenja i oslobađanja (Muller i sur., 2013). Druga

strategija metode punjenja proteinom testirana je za model proteina lipaze, strategiju označenu kao ponovljenu apsorpciju, dvostupanjsku metodu koja uključuje opetovano sušenje i apsorpciju i aktivaciju agensom za vezivanje, glutaraldehidom. Granična otopina bila je pritisnuta na osušenu BNC tijekom apsorpcije, a učinkovitost imobilizacije enzima bila je veća od 90%, za različite testirane metode apsorpcije u dva koraka. Imobilizirana lipaza zadržala je 60% svoje prirodne aktivnosti nakon 15 ponovljenih upotreba, što sugerira da je imobilizacija enzima u dva stupnja prikladna za industrijsku primjenu (Wu i sur., 2016). Provedena je imobilizacija enzima lakaze s terapijskom primjenom zbog njenog antibakterijskog djelovanja. Nanošenje enzima izvršeno je uranjanjem BNC membrana, a specifična aktivnost imobiliziranog enzima nije se puno razlikovala od aktivnosti slobodnog enzima. Postupak nanošenja zadržao je određeni stupanj fleksibilnosti i čak poboljšao pristup supstratu, što je rezultiralo visokom antimikrobnom aktivnošću za gram-pozitivne bakterije i prihvatljivom razinom citotoksičnosti za primjenu kao zavoja (Sampaio i sur., 2016).

3. Zaključak

Iako je za liječenje rana i opekotina dostupno nekoliko terapijskih pristupa i na tom je području postignut velik napredak, mjesta za napredak još uvijek ima, jer je uočena potreba hitnog razvoja boljih strategija za ubrzanje zacjeljivanja i oporavka rana, uglavnom za bolesnike sa težim slučajevima opekline. Bakterijska nanoceluloza (BNC) je biopolimer koji izlučuju bakterije izvanstanično, a ima nekoliko prednosti u odnosu na biljnu celulozu, poput čistoće, visoke poroznosti, propusnosti za tekućine i plinove, povećanog kapaciteta upijanja vode i mehaničke čvrstoće. Osim njene prirodne biokompatibilnosti, BNC se može modificirati kako bi se poboljšala antibakterijska aktivnost i optimiralo vrijeme otpuštanja lijekova. Zbog svoje unutarnje strukture, BNC je savršen primjer biotehnološkog odgovora na kliničke probleme.

4. Literatura

Agarwal A., McNulty J. F., Schurr M. J., Murphy C. J., Abbott N. L. (2011) Polymeric materials for chronic wound and burn dressings. U: *Advanced Wound Repair Therapies*. Farrar, D. ur., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc, str. 186–208.

Algar I., Fernandes S., Mondragon G., Castro C., Garcia-Astrain C., Gabilondo N., Retegi A., Eceiza A. (2015) Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. *Journal of Applied Polymer Science* **132**: 41237.

Almeida I. F., Pereira T., Silva N. H., Gomes F. P., Silvestre A. J., Freire C. S., i sur. (2014) Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **86**: 332–336.

Awadhiya A., Kumar D., Rathore K., Fatma B., Verma V. (2017) Synthesis and characterization of agarose-bacterial cellulose biodegradable composites. *Polymer Bulletin* **74**: 2887–2903.

Bäckdahl H., Esguerra M., Delbro D., Risberg B., Gatenholm P. (2008) Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2**: 320–330.

Basu P., Saha N., Bandyopadhyay S., Saha P. (2017) Rheological performance of bacterial cellulose based nonmineralized and mineralized hydrogel scaffolds. *AIP Conference Proceedings* **1843**: 050008.

Bodin A., Bäckdahl H., Fink H., Gustafsson L., Risberg B., Gatenholm P. (2007) Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnology and Bioengineering* **97**: 425–434.

Calum H., Moser C., Jensen P. O., Christophersen L., Maling D. S., van Gennip M., i sur. (2009) Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection. *Clinical & Experimental Immunology* **156**: 102–110.

Cannon R. E., Anderson S. M. (1991) Biogenesis of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Microbiology* **17**: 435–447.

- Castro C., Zuluaga R., Putaux J. L., Caro G., Mondragon I., Ganán P. (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers* **84**: 96–102.
- Castro C., Zuluaga R., Rojas O. J., Filpponen I., Orelma H., Londono M., i sur. (2015) Highly percolated poly (vinyl alcohol) and bacterial nanocellulose synthesized in situ by physical-crosslinking: exploiting polymer synergies for biomedical nanocomposites. *RSC Advances* **5**: 90742–90749.
- Cerrutti P., Roldán P., García R. M., Galvagno M. A., Vázquez A., Foresti M. L. (2016) Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science* **133**: 43–52.
- Chang W. S., Chen H. H. (2016) Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. *Food Hydrocolloids* **53**: 75–83.
- Chawla, P. R., Bajaj I. B., Survase S. A., Singhal R. S. (2009) Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology* **47**: 107–124.
- Chen C. T., Zhang T., Dai B. B., Zhang H., Chen X., Yang J. Z., i sur. (2016) Rapid fabrication of composite hydrogel microfibers for weavable and sustainable antibacterial applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **4**: 6534–6542.
- Chiaoprakobkij N., Sanchavanakit N., Subbalekha K., Pavasant P., Phisalaphong M. (2011) Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. *Carbohydrate Polymers* **85**: 548–553.
- Chu M. L., Gao H. C., Liu S., Wang L., Jia Y. G., Gao M., i sur. (2018) Functionalization of composite bacterial cellulose with C-60 nanoparticles for wound dressing and cancer therapy. *RSC Advances* **8**: 18197–18203.
- Ciechanska D. (2004) Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres and Textiles in Eastern Europe* **12**: 69–72.
- Czaja W., Romanovicz D., Malcolm Brown R. (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* **11**: 403–411.
- Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. M. (2006) Microbial cellulose – the natural

power to heal wounds. *Biomaterials* **27**: 145–151.

Czaja W. K., Young D. J., Kawecki M., Brown R. M. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8**: 1–12.

Davidson J. R. (2015) Current concepts in wound management and wound healing products. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **45**: 537–564.

De Ley J., Gillis M., Swings J. (1984) Acetobacteraceae. U: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA **1**: 267–278.

Fernandes S. N., Geng Y., Vignolini S., Glover B. J., Trindade, A. C., Canejo J. P., i sur. (2013) Structural color and iridescence in transparent sheared cellulosic films. *Macromolecular Chemistry and Physics* **214**: 25–32.

Fernandes S. N., Almeida P. L., Monge N., Aguirre L. E., Reis, D., de Oliveira C. L. P., i sur. (2017) Mind the microgap in iridescent cellulose nanocrystal films. *Advanced Materials* **29**: 1603560.

Figueiredo A. R. P., Figueiredo A. G. P. R., Silva N. H. C. S., Barros-Timmons A., Almeida A., Silvestre, A. J. D., i sur. (2015) Antimicrobial bacterial cellulose nanocomposites prepared by in situ polymerization of 2-aminoethyl methacrylate. *Carbohydrate Polymers* **123**: 443–453.

Fink H. P., Hofmann D., Purz H. J. (1993) *Lateral Order in Microfibrils of Native and Regenerated Cellulose*, Ellis Horwood: New York, NY, USA, str.59

Fonder M. A., Lazarus G. S., Cowan D. A., Aronson-Cook B., Kohli A. R., Mamelak A. J. (2008) Treating the chronic wound: a practical approach to the care of non-healing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**: 185–206.

Foong C. Y., Hamzah M. S. A., Abd Razak S. I., Saidin S., Nayan N. H. M. (2018) Influence of poly(lactic acid) layer on the physical and antibacterial properties of dry bacterial cellulose sheet for potential acute wound healing materials. *Fibers and Polymers* **19**: 263–271.

Foresti M. L., Cerrutti P., Vazquez A. (2015) Bacterial nanocellulose: Synthesis, properties and applications. U: *Polymer Nanocomposites Based on Inorganic and Organic Nanomaterials*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, str. 39–61.

Fujishima A., Rao T. N., Tryk D. A. (2000) Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology, C* **1**: 1– 21.

- Galateanu B., Bunea M. C., Stanescu P., Vasile E., Casarica A., Iovu H., i sur. (2015) *In vitro* studies of bacterial cellulose and magnetic nanoparticles smart nanocomposites for efficient chronic wounds healing. *Stem Cells International* **10**: 195096.
- Gelin K., Bodin A., Gatenholm P., Mihranyan A., Edwards K., Strømme M. (2007) Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. *Polymer* **48**: 7623–7631.
- George J., Ramana K. V., Sabapathy S. N., Jagannath J. H., Bawa A. S. (2005) Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermomechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **37**:189–194.
- Grande C. J., Torres F. G., Gomez C. M.,Bano M. C. (2009) Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* **5**: 1605– 1615.
- Hedlund C. S. (2007) Surgery of the oral cavity and oropharynx. U: *Small Animal Surgery*. Fossum, T. W. ,ur.,Maryland Heights, MO: Mosby Elsevier, str. 339–371.
- Huang H. C., Chen L. C., Lin S. B., Hsu C. P., Chen H. H. (2010) *In situ* modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. *Bioresource Technology* **101**: 6084–6091.
- Huang H. C., Chen L. C., Lin S. B., Chen H. H. (2011) Nanobiomaterials application: in situ modification of bacterial cellulose structure by adding HPMC during fermentation. *Carbohydrate Polymers* **83**: 979–987.
- Huang C., Yang X., Xiong L., Guo H., Luo J., Wang B., Zhang H., Lin X., Chen X. (2015) Evaluating the possibility of using acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation wastewater for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Letters in Applied Microbiology* **60**: 491–496.
- Hult E. L., Yamanaka S., Ishihara M., Sugiyama J. (2003) Aggregation of ribbons in bacterial cellulose induced by high pressure incubation. *Carbohydrate Polymers* **53**: 9–14.
- Ifuku S., Nogi M., Abe K., Handa K., Nakatsubo F., Yano H. (2007) Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: Dependence on acetylgroup DS. *Biomacromolecules* **8**: 1973–1978.

- Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. (2000) Bacterial cellulose—A masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science* **35**: 261–270.
- Janpetch N., Saito N., Rujiravanit R. (2016) Fabrication of bacterial cellulose-ZnO composite via solution plasma process for antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers* **148**: 335–344.
- Jung J. Y., Park J. K., Chang H. N. (2005) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology* **37**: 347–354.
- Khalid A., Ullah H., Ul-Islam M., Khan R., Khan S., Ahmad F., i sur. (2017) Bacterial cellulose-TiO₂ nanocomposites promote healing and tissue regeneration in burn mice model. *RSC Advances* **7**: 47662–47668.
- Khan S., Ul-Islam M., Khattak W. A., Ullah M. W., Park, J. K. (2015) Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. *Cellulose* **22**: 565– 579.
- Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. (2001) Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* **26**: 1561–1603.
- Klemm D., Heublein B., Fink H. P., Bohn A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44**: 3358–3393.
- Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D., Dorris A. (2011) Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition* **50**: 5438–5466.
- Kongruang S. (2008) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **148**: 245–256.
- Krasteva P. V., Bernal-Bayard J., Travier L., Martin F. A., Kaminski P. A., Karimova G., i sur. (2017) Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nature Communications* **8**: 2065.
- Lazarini S. C., de Aquino R., Amaral A. C., Corbi F. C. A., Corbi P. P., Barud H. S., Lustri W. R. (2016) Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose* **23**: 737– 748.

- Li X., Li B., Ma J., Wang X., Zhang S. (2014a) Development of a silk fibroin/HTCC/ PVA sponge for chronic wound dressing. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **29**: 398–411.
- Li Y., Qing S., Zhou J. H., Yang G. (2014b) Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. *Carbohydrate Polymers* **103**: 496–501.
- Li Y., Jiang H., Zheng W. F., Gong N. Y., Chen L. L., Jiang X. Y., Yang G. (2015) Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. *Journal of Materials Chemistry B* **3**: 3498–3507.
- Li Y. T., Lin S. B., Chen L. C., Chen, H. H. (2017a) Antimicrobial activity and controlled release of nanosilvers in bacterial cellulose composites films incorporated with montmorillonites. *Cellulose* **24**: 4871–4883.
- Li Y., Tian Y., Zheng W. S., Feng Y., Huang R., Shao J. X., i sur. (2017b) Composites of bacterial cellulose and small molecule-decorated gold nanoparticles for treating Gram-Negative bacteria-infected wounds. *Small* **13**: 10.
- Lin W. C., Lien C. C., Yeh H. J., Yu C. M., Hsu S. H. (2013) Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers* **94**: 603–611.
- Lin Q. H., Zheng Y. D., Ren L. L., Wu J., Wang H., An J. X., Fan W. (2014) Preparation and characteristic of a sodium alginate/carboxymethylated bacterial cellulose composite with a crosslinking semi-interpenetrating network. *Journal of Applied Polymer Science* **131**: 9.
- Lin Q. H., Zheng Y. D., Wang G. J., Shi X. N., Zhang T., Yu J., Sun J. (2015a) Protein adsorption behaviors of carboxymethylated bacterial cellulose membranes. *International Journal of Biological Macromolecules* **73**: 264–269.
- Lin S. B., Chen C. C., Chen L. C., Chen H. H. (2015b) The bioactive composite film prepared from bacterial cellulose and modified by hydrolyzed gelatin peptide. *Journal of Biomaterials Applications* **29**: 1428–1438.
- Litwiniuk M., Krejner A., Speyrer M. S., Gauto A. R., Grzela T. (2016) Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds* **28**: 78–88.
- Mohamad N., Mohd Amin M. C., Pandey M., Ahmad N., Rajab N. F. (2014) Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: accelerated burn

wound healing in an animal model. *Carbohydrate Polymers* **114**: 312–320.

Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. (2015) Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734). *Cellulose Chemistry and Technology*. **49**: 5–6.

Mohammadnejad J., Yazdian F., Omid M., Rostami A. D., Rasekh B., Fathinia A. (2018) Graphene oxide/silver nanohybrid: Optimization, antibacterial activity and its impregnation on bacterial cellulose as a potential wound dressing based on GO-Ag nanocomposite-coated BC. *Engineering in Life Sciences* **18**: 298–307.

Morgan J. L. W., Strumillo J., Zimmer J. (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**: 181–186.

Muller A., Ni Z., Hessler N., Wesarg F., Muller F. A., Kralisch D., Fischer D. (2013) The biopolymer bacterial nanocellulose as drug delivery system: investigation of drug loading and release using the model protein albumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **102**: 579–592.

Okiyama A., Shirae H., Kano H., Yamanaka S. (1992) Bacterial cellulose. I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocolloids* **6**: 471–477.

Ovington L. G. (2007) Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology* **25**: 33–38.

Padmanaban S., Balaji N., Muthukumar C., Tamilarasan K. (2015) Statistical optimization of process parameters for exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* using sweet potato based medium. *3 Biotechnology* **5**: 1067–1073.

Pal S., Nisi R., Stoppa M., Licciulli A. (2017) Silver-functionalized bacterial cellulose as antibacterial membrane for wound-healing applications. *ACS Omega* **2**: 3632–3639.

Paximada P., Dimitrakopoulou E. A., Tsouko E., Koutinas A. A., Fasseas C., Mandala, I. G. (2016) Structural modification of bacterial cellulose fibrils under ultrasonic irradiation. *Carbohydrate Polymers* **150**: 5–12.

Perez-Mendoza D., Rodriguez-Carvajal M. A., Romero- Jimenez L., Farias Gde A., Lloret J., Gallegos M. T., Sanjuan, J. (2015) Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **112**: E757–E765.

- Phisalaphong M., Jatupaiboon N. (2008) Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose–chitosan film. *Carbohydrate Polymers* **74**: 482–488.
- Phisalaphong M., Suwanmajo T., Tammarate P. (2008) Synthesis and characterization of bacterial cellulose/alginate blend membranes. *Journal of Applied Polymer Science* **107**: 3419–3424.
- Qiao K., Zheng Y. D., Guo S. L., Tan J., Chen X. H., Li J. Q., i sur. (2015) Hydrophilic nanofiber of bacterial cellulose guided the changes in the microstructure and mechanical properties of nf-BC/PVA composites hydrogels. *Compos Science and Technology* **118**: 47–54.
- Qiao H., Guo T., Zheng Y., Zhao L., Sun Y., Liu Y., Xie Y. (2018) A novel microporous oxidized bacterial cellulose/arginine composite and its effect on behavior of fibroblast/endothelial cell. *Carbohydrate Polymers* **184**: 323– 332.
- Rahman M. M., Netravali A. N. (2016) Aligned bacterial cellulose arrays as “Green” nanofibers for composite materials. *ACS Macro Letters* **5**: 1070–1074.
- Rebelo R., Ana A. J. A., Chen X., Liu C., Yang G., Liu Y. (2018) Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties. *Science and Technology of Advanced Materials* **19**: 203–211.
- Rehm B.H.A. (2009) *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*; Caister Academic Press:Poole, UK, str.62
- Ross P., Mayer R., Benziman M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews* **55**: 35–58.
- Ruka D. R., Simon G. P., Dean K. M. (2012) Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* **89**: 613–622.
- Saibuatong O., Phisalaphong M. (2010) Novo aloe-vera bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydrate Polymers* **79**: 455–460.
- Sampaio L. M., Padrao J., Faria J., Silva J. P., Silva C. J., Dourado F., Zille A. (2016) Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydrate Polymers* **145**: 1–12.

Sani A., Dahman Y. (2009) Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **85**: 151–164.

Savitskaya I. S., Kistaubayeva A. S., Digel I. E., Shokatayeva D. H. (2017) Physicochemical and antibacterial properties of composite films based on bacterial cellulose and chitosan for wound dressing materials. *Eurasian Chemico-Technological Journal* **19**: 255–264.

Saxena I. M., Brown R. M. (2012) Biosynthesis of bacterial cellulose. U: *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*. CRC Press: Boca Raton, FL, SAD, str. 1–18.

Schramm M., Hestrin S. (1954) Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *Microbiology* **11**: 123–129.

Seifert M., Hesse S., Kabrelian V., Klemm D. (2004) Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**: 463–470.

Shah N., Ul-Islam M., Khattak W. A., Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymer* **98**: 1585– 1598.

Shao W., Liu H., Wang S. X., Wu J. M., Huang M., Min H. H., Liu X. F. (2016a) Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes. *Carbohydrate Polymer* **145**: 114–120.

Shao W., Liu H., Wu J. M., Wang S. X., Liu X. F., Huang M., Xu P. (2016b) Preparation, antibacterial activity and pH-responsive release behavior of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose for wound dressing applications. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **63**: 404–410.

Silva N. H., Rodrigues A. F., Almeida I. F., Costa P. C., Rosado C., Neto C. P., i sur. (2014) Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: in vitro dissolution and permeation studies. *Carbohydrate Polymers* **106**: 264–269.

Son H., Heo M., Kim Y., Lee S. (2001) Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **33**: 1–5.

Sulaeva I., Henniges U., Rosenau T., Potthast A. (2015) Bacterial cellulose as a material for

wound treatment: properties and modifications - A review. *Biotechnology Advances* **33**: 1547–1571.

Sun Y., Meng C., Zheng Y., Xie Y., He W., Wang Y., i sur. (2018) The effects of two biocompatible plasticizers on the performance of dry bacterial cellulose membrane: a comparative study. *Cellulose* **25**: 5893–908.

Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D. L., Brittberg M., Gatenholm P. (2005) Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* **26**:419–431.

Tabaie M. J., Emtiazi G. (2018) Transparent nontoxic antibacterial wound dressing based on silver nano particle/bacterial cellulose nano composite synthesized in the presence of tripolyphosphate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **44**: 244–253.

Tanaka M., Murakami S., Shinke R., Aoki K. (2000) Genetic characteristic of cellulose-forming acetic acid bacteria identified phenotypically as *Gluconacetobacter xylinus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64**: 757–760.

Tang W., Jia S., Jia Y., Yang H. (2010) The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 125.

Tanskul S., Amornthatree K., Jaturonlak N. (2013) A new cellulose-producing bacterium *Rhodococcus sp.* MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers* **92**: 421–428.

Trovatti E., Freire C.S., Pinto P. C., Almeida I. F., Costa P., Silvestre A. J., i sur. (2012) Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: in vitro diffusion studies. *International Journal of Pharmaceutics* **435**: 83–87.

Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 14832–14849.

Tyagi N., Suresh S. (2016) Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: Optimization & characterization. *Journal of Cleaner Production* **112**: 71–80.

Ul-Islam M., Khan T., Park J. K. (2012a) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by In Situ and Ex Situ modification. *Carbohydrate Polymers* **88**: 596-603.

Ul-Islam M., Khan T., Park J. K. (2012b) Nanoreinforced bacterial cellulose–montmorillonite composites for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **89**: 1189–1197.

Ul-Islam M., Khan S., Ullah M. W., Park J. K. (2015) Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in biomedical and electroconductive fields. *Biotechnology Journal* **10**: 1847–1861.

Umeda Y., Hirano A., Ishibashi M., Akiyama H., Onizuka T., Ikeuchi M., Inoue Y. (1999) Cloning of cellulose synthase genes from *Acetobacter xylinum* JCM 7664: implication of a novel set of cellulose synthase genes. *DNA Research* **6**: 109–115.

Valla S., Coucheron D. H., Fjærvik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M. (1989) Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Molecular Genetics and Genomics* **217**: 26–30.

Wang J., Wan Y. Z., Luo H. L., Gao C., Huang, Y. (2012) Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique. *Materials Science and Engineering C* **32**: 536–541.

Watanabe K., Yamanaka S. (1995) Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 65–68.

Watanabe K., Tabuchi M., Morinaga Y., Yoshinaga F. (1998) Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**: 187–200.

Wen X. X., Zheng Y. D., Wu J., Yue L. N., Wang C., Luan J. B., i sur. (2015) In vitro and in vivo investigation of bacterial cellulose dressing containing uniform silver sulfadiazine nanoparticles for burn wound healing. *Progress in Natural Science-Materials International* **25**: 197–203.

Volova T. G., Shumilova A. A., Shidlovskiy I. P., Nikolaeva E. D., Sukovatiy A. G., Vasiliev A. D., and Shishatskaya, E. I. (2018) Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics. *Polymer Testing* **65**: 54–68.

- Wu S. C., Sian-Ming W., Feng-Min S. (2016) Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **92**: 109–114.
- Wu C. N., Fuh S. C., Lin S. P., Lin Y. Y., Chen H. Y., Liu J. M., Cheng, K. C. (2018) TEMPO-oxidized bacterial cellulose pellicle with silver nanoparticles for wound dressing. *Biomacromolecules* **19**: 544–554.
- Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N., Iguchi M., Mitsuhashi S., Nishi Y., i sur. (1989) The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science* **24**: 3141–3145.
- Yano H., Sugiyama J., Nakagaito A. N., Nogi M., Matsuura T., Hikita M., Handa K.(2005) Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers. *Advanced Materials* **17**: 153–155.
- Yin N., Chen S., Li Z., Ouyang Y., Hu W., Tang L., i sur. (2012) Porous bacterial cellulose prepared by a facile surfactant-assisted foaming method in azodicarbonamide- NaOH aqueous solution. *Materials Letters* **81**: 131–134.
- Yu J. W., Liu X. L., Liu C. S., Dong, P. (2011) Biosynthesis of carboxymethylated bacterial cellulose composite for wound dressing. *Materials Science Forum* **685**: 322–326.
- Zhou L. L., Sun D. P., Hu L. Y., Li Y. W., Yang J. Z. (2007) Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 483.
- Zhang P., Chen L., Zhang Q. S., Hong F. F. (2016) Using in situ dynamic cultures to rapidly biofabricate fabric- reinforced composites of chitosan/bacterial nanocellulose for antibacterial wound dressings. *Frontiers in Microbiology* **7**: 260.
- Zmejkoski D., Spasojević D., Orlovska I., Kozyrovska N., Sokovic M., Glamoclija J., i sur. (2018) Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* **118**: 494– 503.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Margareta Zančić

ime i prezime studenta