

# Bakterijska nanoceluloza

---

**Mlakić, Lucija**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:207630>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Lucija Mlakić**

7435/BT

**BAKTERIJSKA NANOCELULOZA**  
**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

### BAKTERIJSKA NANOCELULOZA Lucija Mlakić, 7435/BT

**Sažetak:** Primjena biomase za razvoj biobaziranih proizvoda postala je svakodnevica u evolucijskom metaboličkom inženjeringu. Bakterijska nanoceluloza (BNC) koju proizvodi združena kultura kvasca i bakterija je nova alternativa polimerima fosilnog podrijetla. Zahvaljujući tome proizvodnja BNC postala je izrazito popularna zbog svojih ekološki prihvatljivih svojstava. BNC je obnovljiv prirodni polisaharid zbog jedinstvenih karakteristika poput visokog stupnja kristaliničnosti, visoke čistoće, visokog kapaciteta zadržavanja vode, visoke mehaničke čvrstoće i poboljšane biokompatibilnosti. Zbog tih izvanrednih svojstava, BNC može poslužiti kao idealna sirovina za razvoj različitih industrijskih proizvoda. Celulozni nanomaterijali pružaju novu i održivu platformu za proizvodnju materijala visokih performansi koje omogućava nanotehnologija. BNC je visoko kristalična sirovina i građena je od čiste celuloze bez lignina, hemiceluloze i pektina. Ovaj ekstracelularni biopolimer ima specifičnu ulogu kao izvor rezervne energije, zaštitni biofilm, pomaže u uspostavljanju simbioze, osmotskoj prilagodbi i omogućuje različitim rodovima mikroorganizmima da djeluju, prilagode se, umnožavaju i učinkovito opstanu u promjenjivim okolišnim uvjetima.

**Ključne riječi:** bakterijska nanoceluloza, biosinteza, održiva proizvodnja, primjena

**Rad sadrži:** 35 stranica, 11 slika, 0 tablica, 139 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:** rujan 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** **Lucija Mlakić, 7435/BT**

**Abstract:** Application of biomass for the development of biobased products has become a routine agenda in evolutionary metabolic engineering. Bacterial nanocellulose (BNC), which is produced by a symbiotic culture of yeast and bacteria, is a new alternative to conventional polymers based on petroleum. Because of that the production of BNC is becoming increasingly popular owing to its environmentally friendly properties. BNC is renewable natural polysaccharide due to its remarkable properties such as high degree of crystallinity, high purity, high water retention capacity, high mechanical strength, and enhanced biocompatibility. Favored with those extraordinary properties, BC could serve as an ideal biomass for the development of various industrial products. Cellulosic nanomaterials provide a novel and sustainable platform for the production of high performance materials enabled by nanotechnology. BNC is a highly crystalline material and contains pure cellulose without lignin, hemicellulose, and pectin. These extracellular biopolymer plays specific roles as energy reserve material, protective agent, aid in cell functioning, the establishment of symbiosis, osmotic adaptation and support the microbial genera to function, adapt, multiply and survive efficiently under changing environmental conditions.

**Keywords:** Bacterial nanocellulose, Biosynthesis, Sustainable production, Application

**Thesis contains:** 35 pages, 11 figures, 0 tables, 139 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:** September, 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Biljna celulozna (BC) biomasa i bakterijska nanoceluloza (BNC)</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Bakterijske vrste sa sposobnošću proizvodnje BNC</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. Metabolički put sinteze BNC</b> .....	<b>6</b>
<b>2.4. Uzgoj BNC</b> .....	<b>9</b>
2.4.1. Izvori ugljika .....	9
2.4.2. Potreba za kisikom.....	10
2.4.3. Produžena fermentacija.....	11
2.4.4. Načini uzgoja.....	11
<b>2.5. Uzgoj u bioreaktorima</b> .....	<b>13</b>
2.5.1. Airlift bioreaktor.....	13
2.5.2. Bioreaktor s rotirajućim diskom.....	14
2.5.3. Imobilizacija stanica i biofilm reaktori .....	15
<b>2.6. Svojstva BNC</b> .....	<b>17</b>
2.6.1. Morfološka i mehanička svojstva .....	17
<b>2.7. Primjena BNC</b> .....	<b>17</b>
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>20</b>
<b>4. LITERATURA</b> .....	<b>21</b>

## 1. UVOD

Bakterijska nanoceluloza (BNC) je prirodni egzopolisaharidni nanomaterijal koji sintetiziraju neki rodovi bakterija, a najpoznatiji rod je *Komagataeibacter* koji se uzgaja u hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika i dušika (Rajwade i sur., 2015). U usporedbi s drugim rodovima, *Komagataeibacter* najbolji je izbor za istraživanja uzgoja i primjene BNC, zbog visokog prinosa i čistoće sintetizirane nanoceluloze (Ruka i sur., 2012). Biosintetiziranu BNC prvi su uočili stari Kinezi kao plutajuću opnu na površini *kombucha* čaja, fermentiranog napitka proizvedenog s združenom kulturom bakterija octene kiseline i kvasca ugrađenih u nanoceluloznu pelikulu (opnu) formiranu na površini napitka (Marsh i sur., 2014). Neka od mogućih objašnjenja sinteze BNC je da se formira kao mehanizam samoobrane za zaštitu bakterija od štetnog djelovanja UV svjetla ili za pomoć bakterijama da plutaju na međufaznoj površini zrak-tekućina kako bi osigurale dovoljnu opskrbu kisikom (Reiniati i sur., 2017). BNC ne sadrži lignin, hemicelulozu i pektin koji su prisutni u celulozi biljnog podrijetla, stoga je pročišćavanje BNC jednostavan, niskoenergijski proces (Huang i sur., 2014), za razliku od višestupanjskih postupaka pročišćavanja celuloze iz biljaka i drveća (Azeredo i sur. 2019). Prostorni raspored vlakana rezultira indeksom kristaliničnosti do 85% (Siró i Plackett, 2010). Jedinstvena svojstva BNC su veći stupanj polimerizacije i izuzetna vlačna svojstva zbog trodimenzijske mrežne strukture (Iguchi i sur., 2000; Tsouko i sur., 2015; Paximada i sur., 2016b). U usporedbi s biljnom celulozom, BNC vlakna također imaju veći kapacitet zadržavanja vode i dulje vrijeme sušenja, odnosno otpuštanja vode (Meftahi i sur., 2009).

Prinos i svojstva BNC ovise o nekoliko čimbenika, uključujući bakterijski soj koji se koristi, sastav hranjive podloge i uvjete uzgoja. Sastav hranjive podloge određuje morfologiju i fizikalno-kemijska svojstva dobivene nanoceluloze, što utječe na raspon mogućih primjena nakon izolacije i pročišćavanja. Ovisno o primjeni, BNC može poboljšati mehaničku kvalitetu biomaterijala zahvaljujući biokompatibilnosti, biofunktionalnosti, netoksičnosti, i jednostavnosti sterilizacije (Klemm i sur., 2011). Zbog ovih svojstava, trenutno postoji nekoliko metodologija za proizvodnju BNC u velikim mjerilima. Istraživači su se fokusirali na poboljšanje učinkovitosti proizvodnog procesa, što je rezultiralo zadovoljavajućim prinosima koji su kompatibilni s potražnjom za ovom vrstom nanoceluloze (Lin i sur. 2014; Zhang i sur. 2014; Cakar i sur. 2014; Li i sur. 2015).

U ovom radu su pregledno navedene razlike između biljne celuloze i BNC, detaljan metabolički put sinteze BNC, uzgoj s posebnim osvrtom na izvore ugljika, načine uzgoja, te bioreaktore za industrijsku proizvodnju BNC, kao i njena morfološka i mehanička svojstva. Navedene su mogućnosti primjene BNC, te važnost održive proizvodnje i potrošnje ovog visokovrijednog proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

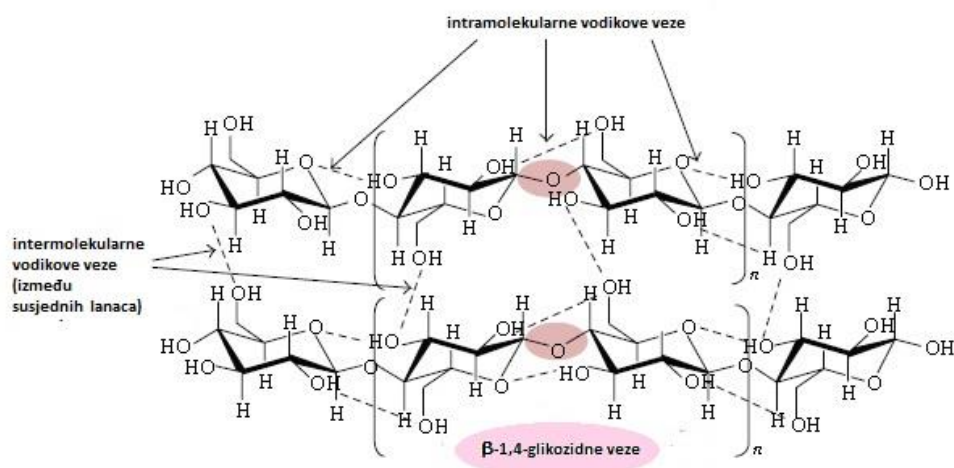
### 2.1. Biljna celulozna (BC) biomasa i bakterijska nanoceluloza (BNC)

Celuloza je glavni biopolimer na Zemlji i od ogromne je ekonomske važnosti u svijetu. Glavni je sastojak pamuka (preko 94%) i drvene biomase (preko 50%). Celuloza iz glavnih travnatih i šumskih biljaka i pamuka građena je od glukoznih jedinica koja se fotosintetski stvara u živoj biljnoj stanici. U oceanima se, međutim, većina celuloze proizvodi preko jednostaničnih planktona, plaštenjaka ili algi koji fiksiraju ugljični dioksid. Zapravo se vjeruje da ti organizmi predstavljaju prve u golemom lancu hrane i najveći su prirodni resurs za proizvodnju celuloze. Bez fotosintetskih mikroorganizama sav životinjski svijet u oceanima prestao bi postojati (Keshk, 2014).

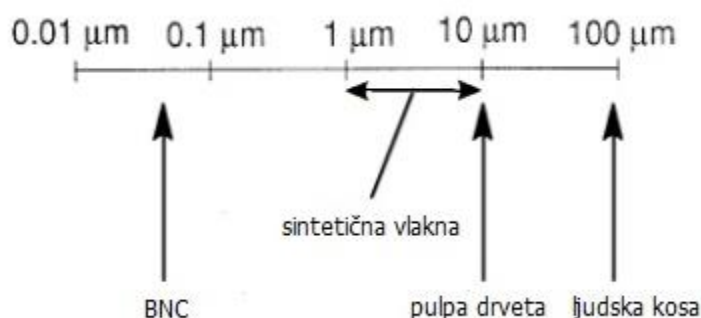
Prema procjenama, količina celuloze koja se svake godine globalno sintetizira iznosi između 100 i 150 milijardi tona (Hon 1994), stoga se smatra da će prerada celuloze zadovoljiti sve veću potrebu za ekološki prihvatljivim proizvodima koji zamjenjuju proizvode dobivene preradom nafte. Ovi prirodni polimeri obično se koriste u širokom rasponu područja kao što su izrada posebnih vrsta papira (Saikia i sur. 1997), tekstilna industrija (Perepelkin i sur. 1997.), biomedicina (Hoenich 2007), proizvodnja punila u automobilskoj industriji (gume) (Bhatnagar i Sain 2005; Wu i dr. 2007), upravo zbog dobre biokompatibilnosti, visoke čvrstoće, vlaknaste morfologije i niskih proizvodnih troškova. Iako je celuloza poznati biljni proizvod, neke bakterije privukle su pažnju kao alternativni i održivi izvor celuloze, a *K. xylinus* reprezentativni je proizvođač bakterijske nanoceluloze (BNC). Strukturu BNC i biljne celuloze čine vlakna građena od  $\beta$ -1,4 glukanskih lanaca i imaju istu molekulsku formulu  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , s "n" vrijednošću između 10 000 i 15 000. Glukanski lanci povezani su intermolekulskim i intramolekulskim vodikovim vezama (Slika 1). Istraživanja provedena na strukturi BNC su pokazala da je kemijski potpuno identična biljnoj celulozi, ali različita prema makromolekularnoj strukturi i svojstvima. Usporedni lanci bakterijske celuloze oblikuju podvlakna širine do 1,5 nm i predstavljaju najtanja prirodno stvorena vlakna, koja se mogu usporediti samo s vlaknima celuloze iz godova drveta (Slika 2) (Torres i sur., 2012).

U usporedbi s biljnom celulozom, BNC ima dodatne prednosti koje su privukle pozornost znanstvenika koji se bave biomaterijalima, a to su izvrsna fizikalna svojstva u pogledu mehaničke stabilnosti, vlačne čvrstoće, termostabilnosti, kristaliničnosti (ultrafine vlaknaste strukture), čistoće i biokompatibilnosti (biološki je netoksična i ne izaziva imunološki odgovor) (Barud i sur., 2011; Cacicedo i sur., 2016).





**Slika 1.** Struktura BNC (Ul-Islam i sur., 2012)

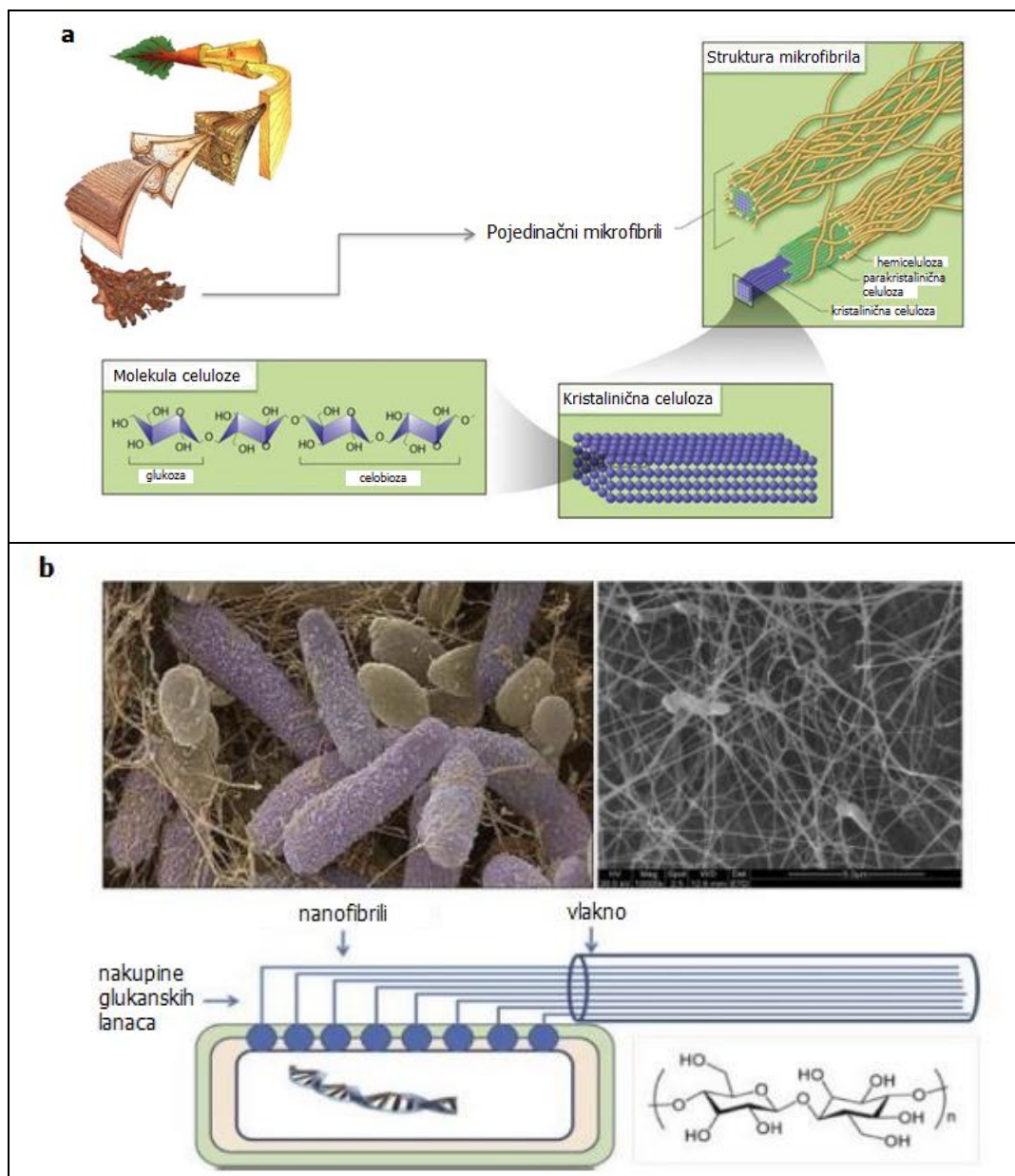


**Slika 2.** Usporedni prikaz širine sintetičnih vlakana, ljudske kose, biljne celuloze i BNC (Torres i sur., 2012)

Pretpostavlja se da bakterije sintetiziraju nanocelulozu u obliku biofilma kao zaštitu od ultraljubičastoga zračenja i nepovoljnih okolišnih uvjeta te zbog učinkovitog transporta kisika (Brown, 2004; Eichhorn i sur., 2001; Iguchi i sur., 2000; Klemm i sur., 2005; Putra i sur., 2008; Retegi i sur., 2010; Shoda i Sugano, 2005; Somerville, 2006), dok je biljna stanična stijenka građena od celuloze uključena u proces regulacije osmotskog tlaka.

Celulozni lanci raspoređeni su u osnovnoj fibrilarnoj jedinici ili kao pojedinačna vlakna duljine od 0,1 do 0,2  $\mu\text{m}$  i imaju karakteristične lateralne dimenzije od 0,0015  $\mu\text{m}$  do 0,0035  $\mu\text{m}$  i nazivaju se celuloznim vlaknima (Klemm i sur., 2005; Ielovich i sur., 2008). Ti se fibrili dalje sjedinjuju u mikrofibrile širinom od 0,1  $\mu\text{m}$  i duljinom od 0,1 do 1  $\mu\text{m}$  (Slika 3a). Ova vlaknasta arhitektura izgrađuje prirodna i umjetna vlakna (Brown i Saxena, 2000).

U usporedbi s biljnom celulozom, BNC ne sadrži hemicelulozu, lignin i pektin i samo vrlo malu količinu karbonilnih i karboksilnih grupa prisutnih u strukturi (Schubert i sur., 2011). BNC posjeduje visoki stupanj kristaliničnosti (iznad 80%) uz izvrstan kapacitet zadržavanja vode i izuzetnu mehaničku čvrstoću, posebice u vlažnim uvjetima. Važna prednost uporabe BNC pred biljnom celulozom je *in situ* sposobnost oblikovanja, odnosno oblikovanja tijekom biosinteze (Klemm i sur., 2001). Uzgoj i sinteza BNC je najvažniji dio, no važno je održavati i pH kulture kulture, jer nizak pH često može dovesti do nakupljanja nusproizvoda, poput glukonske, octene ili mliječne kiseline (Kongruang, 2008). Na Slici 3b prikazana je struktura i sinteza BNC u bakterije *K. xylinus*.



**Slika 3.** Struktura biljne celuloze i bakterijske nanoceluloze; a) struktura mikrofibriila biljne celuloze, b) SEM fotografije *K. xylinus* i sintetizirane BNC (Dutta i sur., 2019)

## 2.2. Bakterijske vrste sa sposobnošću proizvodnje BNC

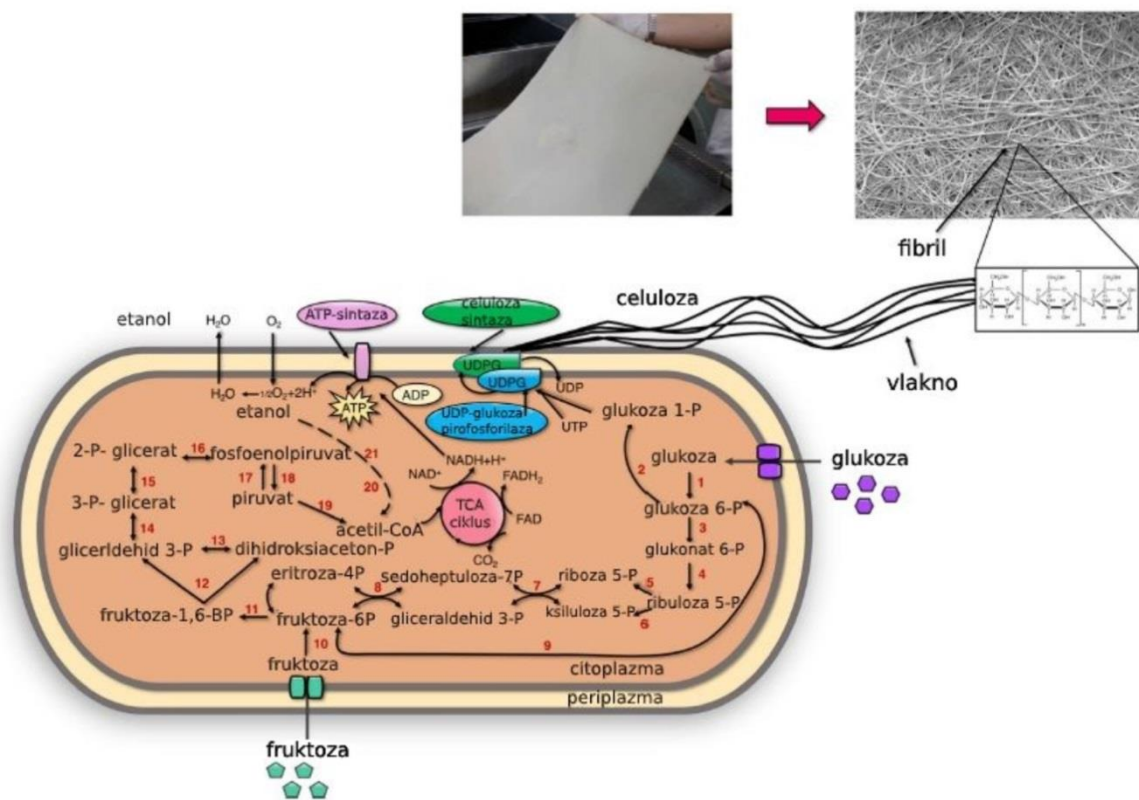
BNC je nanofibrilarni, izvanstanični polisaharid kojeg proizvode razne bakterije u statičnim uvjetima uzgoja, ali i pri submerznom uzgoju uz miješanje. Podloge za uzgoj mogu sadržavati različite izvore ugljika, dušika i faktora rasta, iako se učinkovitost proizvodnje BNC razlikuje uglavnom prema sastavu hranjivih podloga. Supstrat opskrbljuje energijom bakterijski metabolizam tijekom sinteze BNC. Teorijski, svaki atom ugljika koji bakterijska stanica metabolizira do glukoze potreban je za proizvodnju nanoceluloze (White i sur., 1989). Sposobnost proizvodnje BNC razlikuje se među rodovima i vrstama bakterija, ali najistaknutiji i najpoznatiji BNC proizvođač je vrsta *Komagataeibacter xylinus*, koja pripada porodici bakterija octene kiseline (*engl.* Acetic Acid Bacteria; AAB). AAB su strogo aerobne gram-negativne bakterije razvrstane u  $\alpha$ -proteobakterije (Brown, 2004). Vrsta je dugi niz godina bila poznata kao *Acetobacter xylinum*, ali joj je kasnije taksonomski promijenjen naziv u *Gluconacetobacter xylinus* i zbog daljnjih taksonomskih promjena konačno je preklasificirana u *K. xylinus*. *K. xylinus* nije jedina vrsta među AAB s ogromnim potencijalom za BNC sintezu, budući da su i druge vrste, poput *K. hansenii*, *K. medellinensis*, *K. nataicola*, *K. oboediens*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans* i *K. pomaceti* okarakterizirani kao izvrsni proizvođači BNC (Masaoka, 1993). Važan aspekt korištenja AAB za proizvodnju ovog polimera je njihova prisutnost u svakodnevnoj ljudskoj prehrani jer su priznate kao GRAS bakterije (*engl.* Generally Recognized As Safe).

## 2.3. Metabolički put sinteze BNC

Unatoč dugoj povijesti istraživanja BNC i proizvodnog soja *K. xylinus* koja sežu u 1886. godinu (Brown, 1886), detaljni mehanizam biosinteze BNC tek se nedavno počeo razjašnjavati. BNC nastaje iz membranski vezanog enzimskog kompleksa celuloza sintaze koji sintetizira celulozu iz uridin difosfat glukoze (UDP-glukoze) (McNamara i sur., 2015). Nedavno je razjašnjena kristalinična struktura celuloza sintaze iz bakterije *Rhodobacter sphaeroides* koja također proizvodi BNC, a iz strukturnih informacija o celuloza sintazi otkriven je i katalitički mehanizam prijenosa glikozila (Morgan i sur., 2013, 2016).

Biosinteza BNC je precizan proces reguliran mnogobrojnim enzimima i regulatornim proteinima. Iako mehanizam polimerizacije glukoze u nanocelulozu kod bakterija nije potpuno poznat, mehanizam sinteze uridin-difosfoglukoze (UDPGlc) dobro je objašnjen. Biosinteza celuloze uključuje proizvodnju UDPGlc, koji je prekursor u sintezi celuloze, a zatim polimerizaciju glukoze  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama u celulozni lanac. Individualni celulozni lanci izlučuju se kroz pore stanične stijenke iz stanice kao linearni lanci vlakana što uzrokuje

pojavu vlaknaste strukture od mnogobrojnih isprepletenih nanoceluloznih vlakana na površini stanice (Slika 4). Uridin difosfat (UDP)-glukoza nastaje u tri koraka: fosforilacija glukoze glukokinazom, izomerizacija glukoze-6-fosfata u glukozu-1-fosfat fosfoglukomutazom i sinteza UDP-glukoze uridililtransferazom (UTP)-glukoza-1-fosfata. Konačno, celuloza sintaza prenosi ostatke glukozila iz UDP-glukoze u matični  $\beta$ -D-1,4-glukanski lanac. Celuloza sintaza je membranski ugrađena glikoziltransferaza s tri podjedinice (Chawla i sur., 2009). Katalitička podjedinica celuloza sintaze glavna je odrednica kemijskih i fizikalnih svojstava BNC, što znači da su različite vrste bakterija u stanju stvarati nanocelulozu različitih duljina (Huang i sur., 2014).

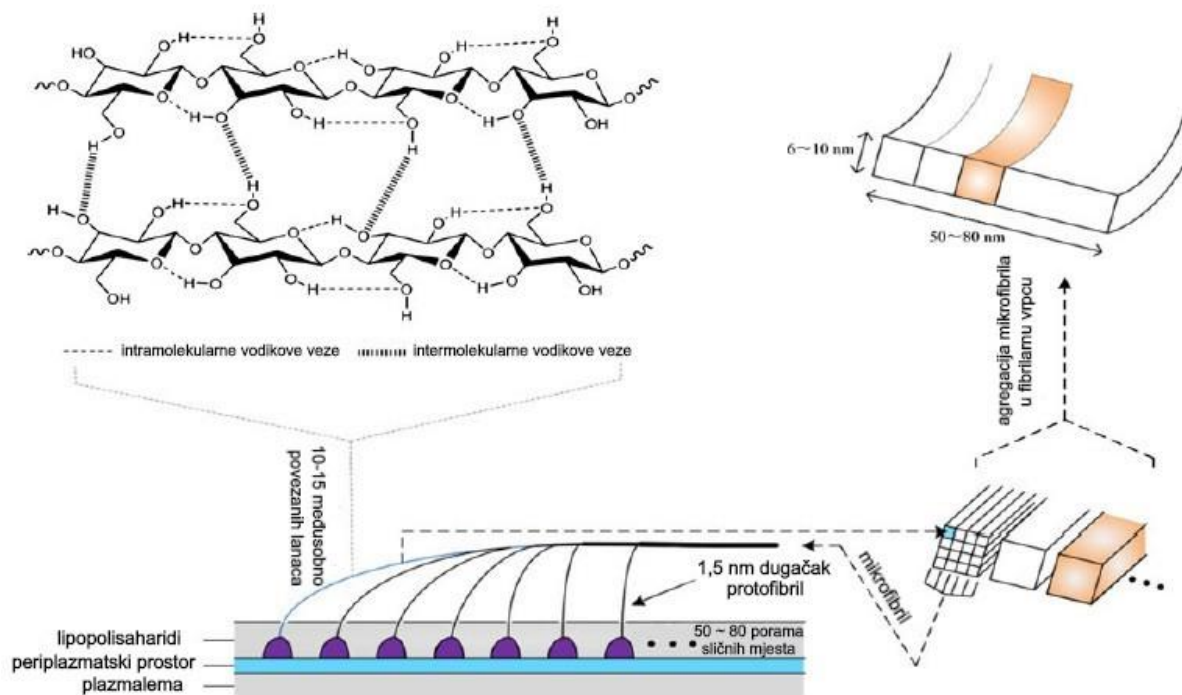


**Slika 4.** Metabolički put biosinteze BNC s *K. xylinus* i sinteza nano fibrila: 1) glukokinaza-ATP, 2) fosfoglukomutaza, 3) glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, 4) 6-fosfoglukonat dehidrogenaza, 5) fosforibuloza-izomeraza, 6) fosforibuloza-epimeraza, 7) stransketolaza, 8) transaldolaza, 9) fosfoglukoza izomeraza, 10) fruktokinaza, 11) fruktokinaza-ATP, 12) aldolaza, 13) triozafosfat izomeraza, 14) glicer aldehid 3-fosfat dehidrogenaza, 15) fosfoglicerat mutaza, 16) enolaza, 17) piruvat kinaza, 18) piruvat bifosfat kinaza, 19) piruvat dehidrogenaza, 20) aldehid dehidrogenaza (Jacek i sur., 2019)

Nakon prijenosa glukoze iz UDP-glukoze na BNC, produljeni lanac BNC translocira se kroz transmembranske pore, međutim, pokretačka snaga translokacije još uvijek nije razjašnjena. Sa sve većim uvidom u strukturu i mehanizam celuloza sintaze trebalo bi biti moguće modificirati ovaj enzimski kompleks s ciljem poboljšanja učinkovitosti polimerizacije i translokacije (Rajwade i sur., 2015).

Usporedbom genoma bakterija octene kiseline otkriveno je da moguće posjedovati više operona za celulozu čiji se sastav razlikuje jedan od drugog. Te razlike vrlo vjerojatno utječu na sintezu BNC, transport celuloze na staničnu površinu i/ili ispreplitanje vlakana u vrpce (Brown i Saxena, 2000). Za razliku od biljne celuloze, BNC proizvedena mikroorganizmima ima jedinstven mehanizam sinteze lančanih molekula nakon čega slijedi agregacija. Jedna stanica *K. xylinus* može polimerizirati do 200 000 molekula glukoze u sekundi (Hestrin i Schramm, 1954) pomoću celuloza sintaze ili specifičnih terminalnih enzimskih kompleksa (TS) koji se nalaze u porama na staničnoj površini, a potom se polimer izlučuje u okolnu podlogu i obično postiže oblik vrpčastog snopa duljine od 1 do 9 nm (Jacek i sur., 2019).

Lateralni i jednosmjerno poravnani lanci međulančano se vežu vodikovim vezama sa svim dostupnim hidroksilnim skupinama. Na taj se način lanci spajaju u netopive nanofibrile do 80 nm širine i duljine od 1 do 9 nm što predstavlja od 2 000 do 18 000 molekula glukoze (Bielecki i sur., 2005). Na SEM snimkama površine BNC uočeno je između 50 i 80 porama sličnih mjesta poslaganih u ravini dužinom cijele stanice *K. xylinum* i bila je vidljiva nakupina ekstracelularnih nanofibrila sakupljenih u snopove (Huang i sur., 2014). Za ovakvu strukturu lipopolisaharidnog sloja se smatra da su mjesta izlučivanja prednanoceluloznih polimera grupiranih u oko 10-15 lanaca koji su međusobno povezani i oblikuju subfibrile širine 1,5 nm (Ross i sur., 1991). Ti se subfibrili grupiraju u fibrilarne snopove širine oko 50-80 nm (Slika 5), koji su 200 puta tanji od pamučnih vlakana i imaju nevjerojatno veliku površinu (Vitta i Thiruvrnadam, 2012). Ovakva struktura rezultira kombinacijom specifičnih svojstava BNC kao što su visoka sposobnost zadržavanja vode, hidrofilnost, kristaličnost i sposobnost modifikacije. Iako su gotovo sve hidroksilne skupine celuloznog polimera zauzete vodikovim vezama, jedan kraj svakog celuloznog polimera sadrži nemodificiranu C4-hidroksilnu skupinu, a suprotni kraj slobodnu C1-hidroksilnu skupinu, a obje predstavljaju moguće skupine za kemijske modifikacije BNC (Ross i sur., 1991).



**Slika 5.** Struktura i organizacija vlakana izlučenih s laterarne strane stanice *K. xylinus* (Huang i sur., 2014)

## 2.4. Uzgoj BNC

### 2.4.1. Izvori ugljika

Industrijska proizvodnja BNC izrazito je skup postupak, većinom zbog visoke cijene kemijski definiranih podloga u velikim volumenima. Najpoznatija kemijski definirana podloga je Hestrin-Schramm podloga (HS) koja se sastoji od (tež/vol): 2% glukoze, 0,5% peptona, 0,5% kvašćevog ekstrakta, 0,27%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0,15% limunske kiseline (Hestrin i Schramm, 1954). Tijekom proizvodnje BNC, uz sintezu pelikule, nastaju i organske kiseline (glukonska, octena, mliječna, glukuronska, limunska) koje snižavaju pH hranjive podloge, što inhibira sintezu BNC (Neffe-Skocinska i sur., 2017). Postoji nekoliko opcija za rješavanje ovog problema koje uključuju razvijanje metaboličkog puta u kojem je smanjeno nastajanje glukonske kiseline, optimiziranje prihranjivanja glukozom i korištenje alternativnih izvora ugljika koji ne uzrokuju nastajanje nusprodukata. Primijećeno je da *K. xylinus* može koristiti različite izvore ugljika poput arabinoze, fruktoze, glicerola, laktoze, jabučne kiseline, maltoze, manitola, manoze, metanola i saharoze (Ruka i sur., 2014). Većina istraživanja potvrdila je da su prinosi BNC najveći s glukozom kao jedinim izvorom ugljika jer se pokazalo da je najbolji izvor energije za bakterije, a i izravno izgrađuje strukturu BNC. U radu Oikawa i sur.



(1995) proučavana je proizvodnja BNC iz D-arabitolu pomoću *G. xylinus* KU-1. Količina dobivene celuloze iz D-arabitolu bila je 6 puta veća od količine dobivene iz D-glukoze. U D-arabitolu hranjivoj podlozi konačni pH se nije smanjio i nije bila prisutna glukonska kiselina, zbog čega je zabilježen veći prinos BNC. Uspoređivanjem prinosa celuloze iz glukoze, galaktoze i ksiloze kao izvora ugljika, pokazalo se da galaktoza i ksiloza daju manji prinos zbog manje brzine rasta mikroorganizama. Mikrofibriili iz proizvodnje na ksilozi bili su manje konzistentni od onih iz proizvodnje na glukozi (Chawla i sur., 2009). Wang i sur. (2018) nedavno su dokazali da je izborom fruktoze kao jedinog izvora ugljika postignut veći prinos BNC nego s glukozom. Također su uočili da je izrazito važan puferski kapacitet hranjive podloge zbog održavanja optimalne pH vrijednosti za proizvodne sojeve bakterija.

Pri izboru alternativnih izvora ugljika u obzir se dodatno moraju uzeti ekonomska isplativnost i reproducibilnost. Pametna uporaba dodatnog izvora ugljika također može poboljšati reproducibilnost koja je često problem jedinstven za proizvodnju mikrobnih biopolimera. Primjerice, otkriveno je da dodavanje octene kiseline poboljšava reproducibilnost proizvodnje BNC. Potrebno je i dalje istraživati fermentaciju i optimizirati sastav podloge kako bi se povećala proizvodnja BNC u industrijskim uvjetima.

#### 2.4.2. Potreba za kisikom

Općenito je znana i prihvaćena hipoteza da je sinteza i ekstracelularno izlučivanje BNC uvjetovana visoko aerobnim uvjetima. Upravo zbog tog nužnog zahtjeva pelikula pluta na površini hranjive podloge bogatom kisikom (Chao i sur., 2000). Kolonije *K. xylinus* pri statičnom uzgoju sintetiziraju vidljivi biofilm nanocelulotnih pelikula koji prekriva površinu hranjive podloge (Ross i sur., 1991). Kada se uzgoj provodi na tresilici ili uz miješanje, *K. xylinus* raste i razmnožava se puno brže kao rezultat povećane koncentracije kisika u podlozi. U tim uvjetima dolazi do sinteze kuglastih oblika nanoceluloze (peleta) umjesto dobro organiziranih pelikula (Chao i sur., 2000; Czaja i sur., 2004). Uzgojem u submerznoj kulturi uz miješanje, koji je primjenjiviji u industrijskim uvjetima, prijenos kisika do stanica dovoljan je za potrebe stanica, no postoji opasnost od smanjenja produktivnosti sinteze BNC zbog povećanog broja nanoceluloza-negativnih mutanata jer je dokazano da *K. xylinus* ATCC 23769 ima sposobnost transformiranja u negativnog mutanta. Dodatna istraživanja provode se kako bi se pronašlo rješenje za rješavanje ovog problema pri proizvodnji BNC u submerznoj kulturi i velikim industrijskim mjerilima (Czaja i sur., 2004). Produktivnost sinteze BNC u uzgoju s miješanjem ovisna je o brzini prijenosa kisika ( $K_L a$ ) (Ishikawa i sur., 1995). Hwang i sur. (1999) objavili su da je produktivnost i prinos nanoceluloze razmjerni brzini

prijenosa kisika i da je optimalna koncentracija kisika (zasićenost podloge), koja je rezultirala najvećim prinosom BNC bila 10%.

#### 2.4.3. Produžena fermentacija

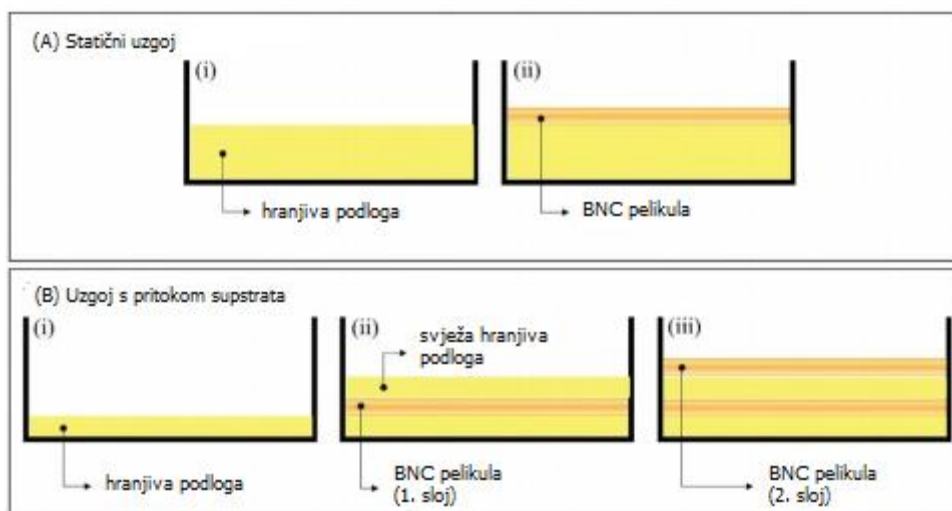
Glavno ograničenje šaržne fermentacije je vrijeme potrebno da se pokrene nova šarža. Mikroorganizmima je potrebno određeno vrijeme da se prilagode uvjetima nove fermentacije nakon inokulacije, koje se naziva *lag* faza ili faza prilagodbe. Zbog toga se provode intenzivna istraživanja kako bi se prinos povećao kontinuiranim uzgojem s ciljevima da se skрати vrijeme čišćenja i sterilizacije bioreaktora (CIP i SIP), izostavi vrijeme pripreme inokuluma, skрати *lag* faza aktivacije stanica i vremena da se proizvede dovoljna količina biomase.

Nekoliko je istraživanja provedeno kako bi se povećala produktivnost sinteze BNC dodatkom različitih sastojaka u hranjivu podlogu. Mogući rezultati djelovanja tih dodataka mogu se prikazati kao rezultat smanjenja sila smicanja povećanjem viskoznosti hranjive podloge (Bae i sur., 2004), prekidom procesa kristalizacije, promjenom tipa stanica (Park i sur., 2003), i povećanjem brzine nastajanja proizvoda (Zhou i sur., 2007). Naritomi i sur. (1998) proveli su kontinuirani uzgoj s dodatkom etanola. Rezultati su pokazali da je uz dodatak 10 g/L etanola hranjivoj podlozi, brzina nastajanja proizvoda bila  $0,95 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  s prinosom BNC od 46%, uz brzinu razrjeđenja od  $0,07 \text{ h}^{-1}$ . Usporedno, prinos BNC u šaržnom uzgoju bio je  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  nakon 36 sati fermentacije. Etanol predstavlja izvor energije za sintezu ATP-a, ali nije supstrat za sintezu BNC.

#### 2.4.4. Načini uzgoja

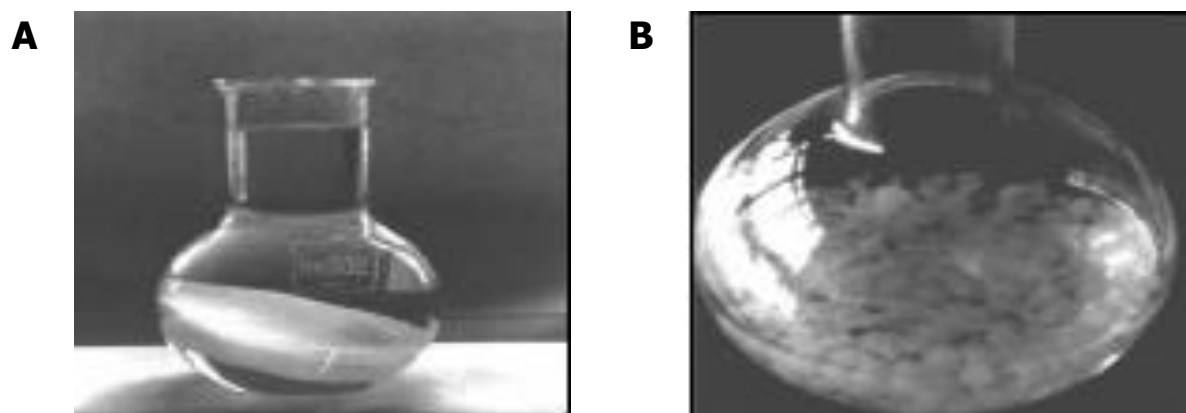
BNC se može proizvoditi statično, na tresilici ili uz miješanje, no svaki od ovih postupaka rezultira različitim oblicima celuloznih vlakana (Slika 6). Pri statičnim uvjetima uzgoja, sintetizirana celuloza građena je od trodimenzionalnih, međusobno isprepletenih vlakna, dok se pri uzgoju na tresilici ili u reaktoru s mješalicom sintetiziraju kugle ili peleti nepravilnog oblika (Tanskul i sur., 2013). Proces sinteze celuloze pod statičkim uvjetima ovisi o opskrbi atmosferskim kisikom na površini, a prinos o koncentraciji izvora ugljika (Budhiono i sur., 1999). Produženjem vremena uzgoja bakterija octene kiseline, povećava se prinos bakterijske celuloze (Sheykhnazari i sur., 2011). Sinteza bakterijske celuloze doseže svoju krajnju granicu kada pelikula pada na dno hranjive podloge, pri čemu bakterije postaju neaktivne zbog nedovoljne opskrbe kisikom (Borzani i DeSouza, 1995). U industrijskoj proizvodnji kao najbolji način pokazao se šaržni proces s pritokom supstrata, jer je postignuta veća produktivnost u odnosu na kontinuirani proces (Slika 6) (Çakar i sur., 2014).





**Slika 6.** Uzgoj BNC: šaržni uzgoj (A), šaržni uzgoj s pritokom supstrata (B) (Blanco Parte i sur., 2020)

Suprotno tome, zbog niskog prinosa pri statičnom načinu proizvodnje, većina bakterijske celuloze koja se koristi u komercijalne svrhe proizvodi se na tresilici. Trešnjom se sintetiziraju nepravilni oblici celuloze, bilo kao vlaknasti ovjes, kugle, peleti ili nepravilna masa (Yan i sur., 2008, Wu i Lia, 2008). Ovakva bakterijska celuloza ima manju kristaliničnost, mehaničku čvrstoću i stupanj polimerizacije u usporedbi s pelikulama iz statične kulture (Shi i sur., 2013. godine). Istraživanja Hu i sur. (2013) pokazala su da se broj sintetiziranih oblika celuloze smanjuje s povećanjem volumena inokuluma, a različite početne koncentracije glukoze utječu na prosječne promjere tih oblika celuloze, no, mehanizam formiranja različitih oblika celuloze uz trešnju još je uvijek nepoznat (Slika 7).



**Slika 7.** Izgled BNC sintetizirane pri statičnom uzgoju (a) i uz miješanje (b) (Bielecki i sur., 2005)

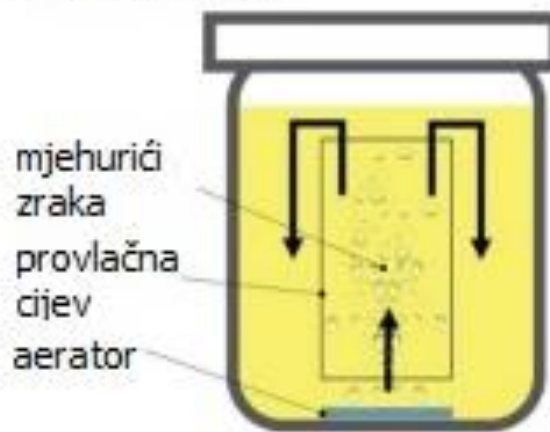
## 2.5. Uzgoj u bioreaktorima

U laboratorijskim sustavima može se provoditi statični uzgoj, no nije prikladan za komercijalnu industrijsku proizvodnju jer je prijenos u veće mjerilo vrlo teško izvedivo, zbog čega su predložene neke izmjene. Dizajnirana je nova posuda za uzgoj kulture kojoj je dno načinjeno od silikonske membrane propusne za kisik (Yoshino i sur., 1996). Time se brzina proizvodnje nanoceluloze udvostručila, jer se na površini zrak-tekućina i na propusnoj silikonskoj membrani mogu formirati pelikule bakterijske nanoceluloze. Također je otkriveno da brzina proizvodnje na silikonskoj membrani ovisi o stupnju hrapavosti površine membrane. Brzina je bila oko pet puta veća na glatkoj površini silikonske membrane nego na hrapavoj (Yoshino i sur., 1996). Hornung i sur. (2007) razvili su novi bioreaktor kojim je omogućeno stvaranje aerosolnog spreja glukoze koji se ravnomjerno raspoređuje po živim bakterijama koje se nalaze na granici između hranjive podloge i zraka. Prosječni rast pelikule bio je 2 mm po danu ili oko 9 g suhe tvari BNC po danu. BNC proizvedena u aerosolnom bioreaktoru ima veću mehaničku čvrstoću od uobičajeno proizvedenog proizvoda u laboratorijskoj posudi za statični uzgoj u termostatu.

### 2.5.1. Airlift bioreaktor

S napretkom fermentacijskih procesa postignuta je visoka koncentracija BNC u kulturi proizvedenoj u bioreaktoru s mehaničkim miješanjem. Međutim, fermentirana podloga s BNC peletima postaje viskozna ne-newtonska otopina, što povećava poteškoće u miješanju kulture i ograničava prijenos kisika (Kouda i sur., 1996). Istražena je proizvodnja s različitim vrstama rotora, ali potrebna je još veća snaga miješanja, stoga se za proizvodnju BNC može primijeniti druga vrsta bioreaktora, airlift bioreaktor, za koji je potrebno manje energije u usporedbi s bioreaktorom s mehaničkim miješanjem (Slika 8). Chao i sur. (1997) prvi su primijenili airlift bioreaktor za proizvodnju BNC. Zrak ili zrak obogaćen kisikom dovodi se s dna i na taj način pokreće cirkulaciju inokulirane hranjive podloge. Kasnije su primijenjene drugačije konfiguracije airlift bioreaktora za poboljšanje proizvodnje BNC. Chao i sur. (2000) upotrijebili su 50-litarski bioreaktor s povratnim tokom u obliku petlje i dobili 3,8 g L<sup>-1</sup> BNC nakon 67 sati fermentacije. Cheng i sur. (2002) proveli su istraživanje u modificiranom airlift reaktoru opremljenom s tri cijevi s žičanom mrežom u kojem je nakon 72-satne fermentacije dobiveno 7,7 g L<sup>-1</sup> BNC. Najviša koncentracija BNC postignuta korištenjem airlift bioreaktora bila je 10,4 g L<sup>-1</sup> sa produktivnosti od 0,22 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Chao i sur., 2011).

## Airlift bioreaktor



**Slika 8.** Grafički prikaz airlift bioreaktora za uzgoj BNC (Blanco Parte i sur., 2020)

### 2.5.2. Bioreaktor s rotirajućim diskom

U bioreaktorima s mehaničkim miješanjem i airlift bioreaktorima, dolazi do adhezije BNC na osovinu i gornji dio bioreaktora što negativno utječe na homogenu raspodjelu biomase i povećava poteškoće pri uklanjanju produkta. Dodatni problem je činjenica da proizvedeni BNC peleti pokazuju malu mehaničku čvrstoću što ograničava njihovu moguću primjenu u usporedbi s BNC pelikulama. Serafica (1997) je prva izvijestila o proizvodnji BNC u bioreaktoru s rotirajućim diskom koji se sastoji od cilindričnog otvora za inokulaciju i koji je opremljen s nekoliko kružnih diskova postavljenih na rotirajućem središnjem vratilu. Bioreaktor s rotirajućim diskovima dizajniran je tako da je polovica njegovih diskova bila potopljena u mediju, a druga polovica izložena atmosferi. Kontinuiranom rotacijom diskova, njihova površina naizmjenično se nalazi u hranjivoj podlozi i zračnom prostoru. Prednost ovog dizajna je u tome što se proizvedena BNC, uz aeraciju, pričvršćuje na diskove i time dobiva na mehaničkoj čvrstoći (Slika 9).

Krystynowicz i sur. (2002) istraživali su optimalne fermentacijske uvjete (volumen hranjive podloge, brzina rotacije i broj diskova) za proizvodnju BNC. Maksimalni prinos BNC dobiven je pri 4 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , a omjer površine i hranjive podloge iznosio je 0,71. U ovom su bioreaktoru provedena istraživanja dodavanjem različitih čvrstih čestica kako bi se dobio novi kompozit BNC. Rezultati istraživanja su pokazali da je ugradnja čvrstih čestica u celuloznu matricu povezana s njihovom koncentracijom i brzinom rotacije. Dodatkom papirnih vlakana obične biljne celuloze dobiven je kompozit BNC povećane čvrstoće i otpornosti (Serafica i sur., 2002).



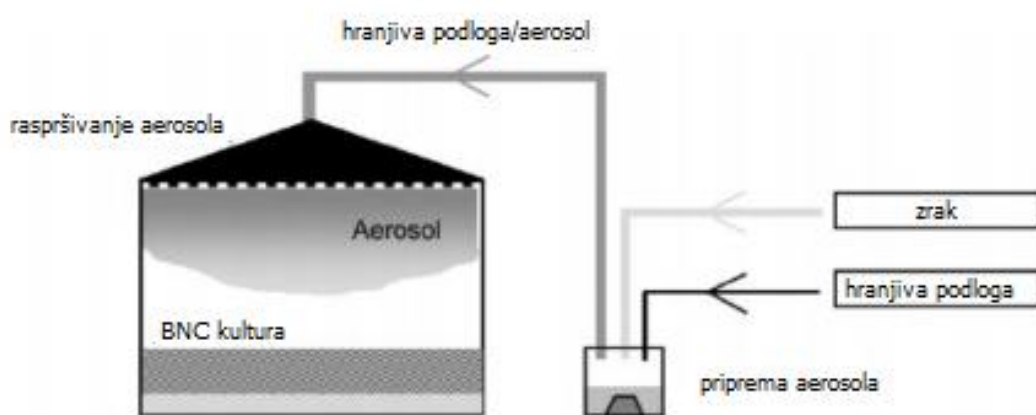
**Slika 9.** Uzgoj BNC u reaktoru s rotirajućim diskovima (Lee i sur., 2014)

### 2.5.3. Imobilizacija stanica i biofilm reaktori

Istraživači su pokušali povećati produktivnost fermentacije korištenjem bioreaktora s imobiliziranim stanicama, bioreaktora s reciklacijom i bioreaktora sa šupljim vlaknima. Vrsta bioreaktora s imobiliziranim stanicama – biofilm reaktori, izvrstan su primjer bioreaktora s visokom gustoćom biomase po jedinici volumena te s manjom tendencijom nastajanja membrana, čime se smanjuju kapitalni troškovi. Fukuda (1995) je kategorizirao tehnike imobilizacije u dvije skupine: 1) aktivna ili umjetna imobilizacija; 2) pasivna ili neutralna imobilizacija. Aktivna imobilizacija koja uključuje kovalentno vezanje na površinu korištenjem različitih veznih agensa i umrežavanje u polimernu matricu, može se postići korištenjem kemijskih agensa. Pasivna imobilizacija postiže se prirodnom adsorpcijom i koloniziranjem mikrobnog filma oko ili unutar čvrstih nosača. Biofilm reaktori imaju nekoliko prednosti u odnosu na bioreaktore sa suspendiranim stanicama, posebice zbog postignute gustoće biomase, praktičnost rada i boljeg prinosa. Biofilm reaktori mogu zadržati 5 do 10 puta više biomase po jedinici volumena bioreaktora čime se povećava produktivnost i smanjuje rizik od ispiranja stanica pri radu s visokim koeficijentima razrjeđenja te uklanja potreba za ponovnom inokulacijom za vrijeme polukontinuiranih procesa. Nadalje, struktura matrice biofilma doprinosi visokoj otpornosti mikroorganizama na ekstremne uvjete pH i temperature, toksične kemikalije, antibiotike i mehanički šok (Ho i sur. 1997; White, 1984; Norwood i Gilmour, 2000; Demirci i sur., 2007; Cheng i sur., 2009c). Najvažnija je činjenica

da proizvodi reaktora s biofilmom imaju veliku mogućnost obnavljanja u usporedbi s proizvodima bioreaktora sa suspendiranim stanicama što rezultira učinkovitijim procesima izdvajanja i prerade. Cheng i sur. (2009b) uspješno su poboljšali proizvodnju BNC korištenjem PCS biofilm reaktora. Rezultati pokazuju da PCS biofilm reaktori imaju prinos BNC od  $7,05 \text{ g L}^{-1}$  što je 2,5 puta više od prinosa kontrolnog procesa ( $2,82 \text{ g L}^{-1}$ ). Analiza mehaničke čvrstoće pokazala je da proizvedena BNC ima strukturu sličnu pelikuli i ima poboljšanu vlačnu čvrstoću do točke koja je usporediva s pelikularnom strukturom, što može proširiti njene potencijalne primjene. Međutim, nije jasno u kojoj mjeri su PCS komponente ugrađene u celulozni matriks. Nosači od čvrste podloge daju mogućnost uvođenja željenih aditiva u proizvedenu BNC što omogućava stvaranje novonačinjenih materijala.

Budući da je BNC proizvod velike molekulske mase, na proizvodnju značajno utječe vrsta bioreaktora te su zato dizajnirani novi bioreaktori koji povećavaju prinos BNC istovremeno smanjujući mogućnost nastajanja stanica koje nisu proizvođači, a uzrokuju genske mutacije. Na primjer, rotacijski i aerosolni bioreaktori mogu se koristiti za bolji prijenos kisika iz zraka i sastojaka hranjive podloge što rezultira boljim rastom stanica i proizvodnjom BNC. Za bolje prinose, umjesto uzgoja u bioreaktorima s miješanjem kod kojih dolazi do visokih sila smicanja, BNC se uzgaja na čvrstoj podlozi u membranskim bioreaktorima s niskim smičnim naprezanjem (Lee i sur., 2014). Kultivacija *K. xylinus* u aerosolnom bioreaktoru (Slika 10) daje najveću produktivnost BNC u usporedbi s drugim bioreaktorima i to od  $0,38 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Lee i sur., 2014). Međutim, treba napomenuti da vrstu bioreaktora treba pažljivo odabrati ovisno o željenim fizikalnim svojstvima BNC koja se proizvodi (Campano i sur., 2016).



**Slika 10.** Uzgoj BNC u aerosol bioreaktoru (Lee i sur., 2014)

## 2.6. Svojstva BNC

### 2.6.1. Morfološka i mehanička svojstva

Mikrograf stanične ovojnice pokazuje prisutnost 50–80 porama sličnih mjesta smještenih u pravilnom nizu duž uzdužne osi stanice i u blizini ekstracelularnih traka celuloze (Brown i sur. 1976; Zaar 1979). Za ove strukture lipopolisaharidnog sloja pretpostavlja se da su mjesta izlučivanja preceluloznih polimera u skupinama od 10–15 lanaca koji se međusobno povezuju tvoreći takozvane protofibrile širine 1,5 nm (Ross i sur., 1991). Protofibrili se nakupljaju u mikrofibrile, a zatim se njihovom daljnjom agregacijom formiraju vlaknaste vrpce širine od oko 50–80 nm koje su 200 puta finije strukture od pamučnih vlakana i imaju izuzetno veliku specifičnu površinu (Vitta i Thiruvengadam 2012).

Prostorni raspored udruživanja protofibrila ima za posljedicu visoku kristaliničnost BNC čak do 84–89% (Czaja i sur. 2004), a za biljnu celulozu podaci variraju od 40 do 60% (Jonas i Farah 1998). To rezultira Youngovim modulom elastičnosti BNC u rasponu od 15 do 35 GPa dok je vlačna čvrstoća u opsegu 200–300 MPa (Brown i sur. 1976). Relativno visoki modul čini BNC ojačavajućim elementom u polimernim matricama. Kristalne strukture celuloza dobivenih iz različitih izvora razlikuju se u pogledu dvaju kristalnih sustava:  $I_{\alpha}$  i  $I_{\beta}$ . Kristalni sustav celuloze  $I_{\alpha}$  je triklinski, a celuloze  $I_{\beta}$  je monoklinski. Zabilježeno je da je većina biljne celuloze sadrži  $I_{\beta}$  celulozu, dok BNC pretežno sadrži  $I_{\alpha}$  celulozu (Sugiyama i sur. 1985) čiji udio prelazi 80% (Sun et al. 2007). Kristalinična struktura jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječu na mehanička i međupovršinska svojstva celuloze (Nishiyama i sur. 2002).

## 2.7. Primjena BNC

Industrijska proizvodnja BNC nije do sada u potpunosti ekonomski isplativa, no izvrsna biokompatibilnost BNC potaknula je razvoj biomedicinskih proizvoda poput veziva za regeneraciju koštanog tkiva, umjetnih krvnih žila, umjetne kože i zubnih implantata, što utječe na dodanu vrijednost sintetizirane BNC (Petersen i Gatenholm, 2011). Adhezija stanica na površinu BNC ključna je za tkivno inženjerstvo i umjetna vezivna tkiva te se u tu svrhu pokušavaju koristiti razne molekule koje potiču staničnu adheziju poput peptida arginin-glicin-aspartatne kiseline (RGD) (Andrade i sur., 2013) ili drugi prirodni/sintetski polimeri koji su biokompatibilni, kao što su želatina (Kim i sur., 2010), polietilen glikol (Cai i Kim, 2010) i kolagen (Zhijiang i Guang, 2011). Prednosti BNC visoke čistoće koja se dobiva fermentacijom su olakšano izdvajanje i pročišćavanje proizvoda te mogućnost daljnjih fizičkih i kemijskih modifikacija (Huang i sur., 2014) i zbog takvih prednosti područje primjene BNC proširilo se s prehrambene industrije na kozmetičku, biomedicinsku pa čak i elektroničku industriju. Neki

od poznatih komercijaliziranih proizvoda na bazi BNC uključuju desert želatinaste strukture *Nata de coco* koji se proizvodi na Filipinima kao autohtoni desert (Budhiono i sur., 1999), oblozi za previjanje rana (Czaja i sur., 2006), maske za lice (Ullah i sur., 2016) i akustične dijafragme zvučnika i slušalica (Iguchi i sur., 2000). Da bi oblog za previjanje imao antimikrobna svojstva, u strukturu BNC ugrađuju se anorganske nanočestice (Wu i sur., 2014), antimikrobni peptidi (Basmaji i sur., 2014) i polimeri (Figueiredo i sur., 2013).

Zanimljivo je se BNC koristi u industrijama koje naizgled nisu povezane s biotehnologijom, poput industrije baterija i zaslona. Razvoj električnih vozila i prijenosnih električnih uređaja pokrenuo je sve veću potražnju za raznim načinima skladištenja energije. Baterijski separator u uređajima za pohranu elektrokemijske energije poput litij-ion baterije izvrstan je primjer primjene BNC zahvaljujući visokoj vlačnoj čvrstoći, visokoj termostabilnosti i kristaliničnosti (Zhang i sur., 2015). Baterijski separator mora biti fizikalno i kemijski stabilan kako bi se spriječio izravni kontakt anode i katode, ali treba biti omogućen učinkovit transport iona. Struktura i svojstva baterijskog separatora utječu na učinkovitost baterije. Budući da BNC posjeduje jedinstvenu vlaknastu i trodimenzionalnu umreženu strukturu, smatra se izvanrednim kandidatom za separator akumulatora nove generacije. Separatori akumulatora izrađeni od BNC pokazuju termostabilnost do 180 °C i dobru ionsku vodljivost te se očekuje da će dati iznimno dobru učinkovitost baterija u odnosu na konkurenciju (Jiang i sur., 2015). BNC se također smatra izvanrednim materijalom za uključivanje u matricu koja se koristi u fleksibilnim optoelektronskim filmovima koji se postavljaju između dva vodiča u organskim diodama koje emitiraju svjetlost (OLED) (Legnani i sur., 2008). BNC se zbog svojstava poput visoke kristaliničnosti, zadovoljavajuće poroznosti i velike površine smatra idealnim materijalom za matrice koje služe kao nosači za različite funkcionalizirane materijala (Chen et al., 2016). Međutim, transparentnost i vodljivost matrice temeljene na BNC moraju se dodatno poboljšati postupcima modifikacije poput acetilacije (Ifuku i sur., 2007) i ugrađivanja polikaprolaktona u BNC (Barud i sur., 2013). U skoroj budućnosti, primjena prozirnih optičkih vodljivih kompozita na osnovi BNC dodatno se proširuje na revolucionarne transparentne zaslone (proširena stvarnost) i pametne naočale koje mijenjaju transmisiju svjetlosti kao odgovor na promjenu napona. Primjenom ekološki prihvatljive i održive BNC za proizvodnju ovih potrošačkih proizvoda smanjit će se trenutačno oslanjanje na neobnovljive kemikalije i materijale.

## **2.8. BNC kao primjer održive proizvodnje i potrošnje**

Održivi razvoj postao je jedna od važnijih tema biotehnolozima, odnosno inženjerima mikrobnog metabolizma koji nastoje uspostaviti održive biosustave za proizvodnju industrijski

važnih kemikalija i materijala iz obnovljive biomase. Mikrobna proizvodnja kemikalija i materijala iz obnovljivih izvora može pridonijeti postizanju cilja održivog razvoja i na ekološkoj i na ekonomskoj razini. Sistemsko metaboličko inženjerstvo integrira metaboličko inženjerstvo s biotehnologijom, sintetskom biologijom i evolucijskim inženjerstvom te omogućava učinkovitu bioproizvodnju sve većeg broja kemikalija i materijala (Lee i sur., 2012; Choi i sur., 2015, 2016; Lee i Kim, 2015). Jedan od tih proizvoda koji uspostavljaju održivu proizvodnju i potrošnju je bakterijska nanoceluloza (BNC). BNC ima ogroman potencijal da promijeni svakodnevni život i industriju, odabirom održive proizvodnje i potrošnje (Slika 11).



**Slika 11.** Životni ciklus BNC od bakterijske sinteze do modifikacija nakon izolacije, primjena i biorazgradivost (Jang i sur., 2017)



### **3. Zaključak**

Svestrani egzopolimer, BNC, može se održivo proizvesti iz obnovljivih izvora i mogao bi zamijeniti materijale koji se temelje na fosilnim resursima. BNC proizvedena fermentacijom može se koristiti u razne svrhe, a nakon uporabe razgraditi bez štetnih utjecaja na okoliš čime se postiže kružna ekonomija. Također, BNC posjeduje i neka jedinstvena svojstva u usporedbi sa sintetskim materijalima i osim održivosti i pozitivnog doprinosa na okoliš, omogućava nove funkcionalne primjene.

Unatoč svim pozitivnim svojstvima BNC i dugoj povijesti istraživanja njene biosinteze, najveći problem je niska produktivnost u proizvodnji. Za rješavanje ovog problema potrebno je osmisliti i provesti kreativnije strategije biotehnoške proizvodnje na molekularnoj, staničnoj i bioprocenoj razini. Sustavno biokemijsko inženjerstvo i dalje će imati važnu ulogu u optimizaciji proizvodnje BNC i cilj mu je optimizacija svih bioprocasa tijekom razvijanja radnog soja, uključujući i uporabu sirovina, fermentaciju te postupke izolacije i pročišćavanja. Drugi važan korak koji utječe na sudbinu BNC su procesi koji uključuju fizikalnu i kemijsku modifikaciju BNC kako bi biofunkcionalnost BNC bila prikladna za spomenute primjene. Daljnja istraživanja na području niskih prinosa i poboljšanja svojstava sintetizirane BNC doprinijet će postizanju održive potrošnje i proizvodnje.

#### 4. Literatura

Andrade, F. K., Alexandre, N., Amorim, I., Gartner, F., Mauricio, A. C., Luis, A. L., Gama, M. (2013) Studies on the biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **28**: 97 – 112.

Atalla, R. H., Vanderhart, D. L. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* **223(4633)**: 283 – 285.

Bae, S., Sugano, Y., Shoda, M. (2004) Improvement of Bacterial Cellulose Production by Addition of Agar in a Jar Fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97(1)**: 33 – 38.

Bajpai, A.K., Shukla, S. K., Bhanu, S., Kankane, S. (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* **33**: 1088 – 1118.

Bapiraju K, Sujatha P, Ellaiah P, Ramana T (2005) Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. *African Journal of Biotechnology* **3(11)**: 618 – 621.

Barud, H. S., Regiani, T., Marques, R. F., Lustri, W. R., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J. (2011) Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. *Journal of Nanomaterials* **2011**: 1 – 8.

Barud, H. S., Ribeiro, S. J.L., Carone, C., Ligabue, R., Einloft, S., Queiroz, P., et al. (2013) Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone. *Polimeros* **23**: 135 – 142.

Basmaji, P., de Olyveira, G.M., dos Santos, M.L., Guastaldi, A.C. (2014) Novel antimicrobial peptides bacterial cellulose obtained by symbioses culture between polyhexanide biguanide (PHMB) and green tea. *Journal of Biomaterials Tissue Engineering* **4**: 59 – 64.

Bhatnagar, A., Sain, M. (2005) Processing of cellulose nanofiberreinforced composites. *Journal of reinforced plastics and composites* **24(12)**: 1259 – 1268.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2005) Bacterial Cellulose. U: Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P. Chou, C.-C., Verma, V., Wang, H.-T., Ismadji, S., Cheng, K.-C. (2020) Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology* **40(3)**: 397 – 414.

Brown, A. J. (1886) XLIII-on an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society Transactions* **49**: 432 – 439.

Brown, R. M., Willison, J., Richardson, C. L. (1976) Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73(12)**: 4565 – 4569.

Brown, R. M., Saxena, I. M. (2000) Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 57 – 67.

Brown, R.M. (2004) Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42(3)**: 487 – 495.

Brundtland, G. H. (1987) Our Common Future. Oxford: Oxford University Press.

Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., and Iguchi, M. (1999) Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-decoco culture system. *Carbohydrate Polymers* **40**: 137 – 143.

Cacicedo, M. L., Castro, M. C., Servetas, I., Bosnea, L., Boura, K., Tsafraquidou, P., et al. (2016) Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresource Technology* **213**: 172 – 180.

Cai, Z., Kim, J. (2010) Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose* **17**: 83 – 91.

Çakar, F, Özer, I., Aytakin, A.Ö., Şahin, F. (2014) Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers* **106**, 7 – 13.

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., Negro, C. (2016) Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose* **23**: 57 – 91.

Carreira, P., Mendes, J.A., Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S., Silvestre, A.J., Neto, C.P. (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology* **102(15)**: 7354 – 7360.

Chao, Y., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., Shoda, M. (1997) Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. *Biotechnology Techniques* **11**: 829 – 832.

Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M. (2000) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology & Bioengineering* **68(3)**: 345 – 352.

Chao, Y., Sugano, Y., Shoda, M. (2001) Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 673 – 679.

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, X., Yuan, F., Zhang, H., Huang, Y., Yang, J., Sun, D. (2016) Recent approaches and future prospects of bacterial cellulose-based electroconductive materials. *Journal of Material Sciences* **51**: 5573 – 5588.

Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., Demirci, A. (2009a) Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering* **3**: 12 – 19.

Cheng, K. C., Catchmark, J. M., Demirci, A. (2009b) Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose* **16**: 1033 – 1045.

Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, M. J. (2010) Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 853 – 861.

Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., Demirci, A. (2011) Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules* **12(3)**: 730 – 736.

Cheng, H. P., Wang, P. M., Chen, J. W., Wu, W. T. (2002) Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **35**: 125 – 132.

Choi, C. N., Song, H. J., Kim, M. J., Chang, M. H., Kim, S. J. (2009) Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering* **26(1)**: 136 – 140.

Choi, S., Song, C.W., Shin, J. H., Lee, S. Y. (2015) Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabolic Engineering* **28**: 223 – 239.

Choi, S. Y., Park, S. J., Kim, W. J., Yang, J. E., Lee, H., Shin, J., Lee, S. Y. (2016) One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Natural Biotechnology* **34**: 435 – 440.

Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, R.M. (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* **11(3–4)**: 403 – 411.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, R.M. (2006) Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**: 145 – 151.

Demirci, A., Pongtharangkul, T., Pometto, L. A. III, (2007) Biofilm in the food environment, Blaschek, H. P., Wang, H. H., Agle, M. E., ur., Blackwell Publishing, str. 167 –189.

Dutta, S.D., Patel, D. K., Lim, K. T. (2019) Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering. *Journal of Biological Engineering* **13**: 55 – 74.

El-Saied, H., El-Diwany, A. I., Basta, A.H., Atwa, N. A., El-Ghwas, D.E. (2008) Production and characterization of economical bacterial cellulose. *Bioresources* **3(4)**: 1196 – 1217.

Figueiredo, A.G., Figueiredo, A.R., Alonso-Varona, A., Fernandes, S., Palomares, T., Rubio-Azpeitia, E., et al. (2013) Biocompatible bacterial cellulose-poly (2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films. *Biomedical Resources International* **2013**: 1 – 14.

Fukuda, H. (1995), Asenjo, J. A., Merchuk, J. C., ur., Bioreactor system design. Marcel Dekker, str. 339 – 375.

Ge, H., Du, S., Lin, D., Zhang, J., Xiang, J., Li, Z. (2011) *Gluconacetobacter hansenii* subsp. nov., a High-Yield Bacterial Cellulose Producing Strain Induced by High Hydrostatic Pressure. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **165(7–8)**: 1519 – 1531.

Ha, J. H., Shah, N., Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2011) Bacterial cellulose production from a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. *Process Biochemistry* **46(9)**: 1717 – 1723.

Hestrin, S., Schramm, M. (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal* **58(2)**: 345 – 352.

Ho, K.-L. G., Pometto, A. L. III, Hinz, P. N. (1997) Optimization of L-(+)-lactic acid production by ring and disc plastic composite supports through repeated-batch biofilm fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2533 – 2542.

Hon, D. S. (1994) Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose* **1(1)**: 1–25.

Hong, F., Zhu, Y., Yang, G., Yang, X. (2011) Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **86(5)**: 675 – 680.

Hornung, M., Ludwig, M., Schmauder, H. P. (2007) Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle (Part 3). *Engineering in Life Sciences* **7**: 5 – 41.

Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., Sun, D. (2014) Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* **21**: 1 – 30.

Hu, Y., Catchmark, J. M., Vogler, E.A. (2013) Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth. *Biomacromolecules* **14**: 3444 – 3452.

Hungund, B. S., Gupta, S. (2010a) Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26(10)**: 1823 – 1828.

Hungund, B.S., Gupta, S. (2010b) Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology* **9(32)**: 5170 – 5172.

Hwang, J.W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., Kim, Y. S. (1999) Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88(2)**:183 – 188.

Ioelovich, M., Leykin, A. (2008) Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. *Bioresources* **3**:1403 – 1418.

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 acetyl-group DS. *Biomacromolecules* **8**: 1973 – 1978.

Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000) Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Material Sciences* **35**: 261 – 270.

- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., Tisler, V. (2002) Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **31(7)**: 986 – 991.
- Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. (1995) Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59(12)**: 2259 – 2262.
- Jacek, P., Dourado, F., Gama, N., Bielecki, S. (2019) Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. *Molecular Biotechnology* **12**: 633 – 649.
- Jang, W. D., Hwang, J. H., Kim, H. U., Ryu, J. Y., Lee, S. Y. (2017) Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. *Microbial biotechnology* **10**: 1181 – 1185.
- Jiang, F., Yin, L., Yu, Q., Zhong, C., Zhang, J. (2015) Bacterial cellulose nanofibrous membrane as thermal stable separator for lithium-ion batteries. *Journal of Power Sources* **279**: 21 – 27.
- Jonas, R., Farah, L. F. (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* **59(1)**: 101 – 106.
- Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., Gokhale, D. V. (2006) Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry* **41(1)**: 120 – 126.
- Keshk, S., Sameshima, K. (2005) Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology* **4**: 478 – 482.
- Kim, J., Cai, Z., Chen, Y. (2010) Biocompatible bacterial cellulose composites for biomedical application. *Journal of Nanotechnology Engineered Medicine* **1**: 1–7.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S. (2001) Bacterial synthesized cellulose–artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* **26(9)**: 1561 – 1603 .



Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44(22)**: 3358 – 3393.

Kongruang, S. (2008) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **148(1–3)**: 245 – 256.

Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kamanoyama, M., Kamiwano, M. (1996), Characterization of non-Newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **82**: 382 – 386.

Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1997) Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**: 371 – 376.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S. (2002) Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**: 189 – 195.

Kumagai, A., Mizuno, M., Kato, N., Nozaki, K., Togawa, E., Yamanaka, S., Okuda, K., Saxena, I. M., Amano, Y. (2011) Ultrafine cellulose fibers produced by *Asaia bogorensis*, an acetic acid bacterium. *Biomacromolecules* **12(7)**: 2815 – 2821 .

Kunduru, R. M., Pometto, A. L. III, (1996) Evaluation of plastic composite supports for enhanced ethanol production in biofilm reactors. *Journal of Industrial Microbiology* **16**: 249 – 256.

Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., Nakamura, Y. (2009) Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers* **76(2)**: 333 – 335.

Lee, S. Y., and Kim, H. U. (2015) Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Natural Biotechnology* **33**: 1061 – 1072.

Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., Lee, S. Y. (2012) Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Natural Chemistry and Biology* **8**: 536 – 546.

Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., Bismarck, A. (2014) More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Biosciences* **14**: 10 – 32.

Legnani, C., Vilani, C., Calil, V., Barud, H., Quirino, W., Achete, C. (2008) Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. *Thin Solid Films* **517**: 1016 – 1020.

Masaoka, S., Ohe, T., and Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75(1)**: 18 – 22.

Matsuoka M, Tsuchida T, Matsushita K, Adachi O, Yoshinaga F (1996) A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**: 575 – 579.

McNamara, J. T., Morgan, J. L., Zimmer, J. (2015) A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* **84**: 895 – 921.

Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology* **107(2)**: 576 – 583.

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

Morgan, J. L., McNamara, J. T., Fischer, M., Rich, J., Chen, H. M., Withers, S. G., Zimmer, J. (2016) Observing cellulose biosynthesis and membrane translocation in crystallo. *Nature* **531**: 329 – 334.

Mormino, R., Bungay, H. (2003) Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 503 – 506.

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1998) Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation Biotechnology* **85**: 89 – 95.

Neffe-Skocinska, K., Sionek, Scibisz, I., Kolozyn-Krajewska, D. (2017) Acid content and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CYTA-Journal of Food* **15(4)**: 601 – 607.

Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose Ib from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* **124(31)**: 9074 – 9082.

Norwood, D. E., Gilmour, A. (2000) The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* **88**: 512 – 520.

Oikawa, T., Morino, T., Ameyama, M. (1995) Production of cellulose from D-Arbitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **59**: 1564 – 1565.

Park, J. K., Jung, J. Y., Park, Y. H. (2003) Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters* **25**: 2055 – 2059.

Petersen, N., Gatenholm, P. (2011) Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 1277 – 1286.

Perepelkin, K., Belonogova, M., Smirnova, N. (1997) Determination of shrinkage of textiles made of chemical and flax fibres by different methods. *Fibre Chemistry* **29(3)**: 200 – 205.

Rajwade, J., Paknikar, K., Kumbhar, J. (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 2491 – 2511.

Rani, M. U., Appaiah, A. (2011a) Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology* **61(4)**: 781 – 787.

Rani, M. U., Udayasankar, K., Appaiah, K. (2011b) Properties of bacterial cellulose produced in grape medium by native isolate *Gluconacetobacter sp.* *Journal of Applied Polymer Science* **120(5)**: 2835 – 2841.

Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Ganan, P., de La Caba, K., Mondragon, I. (2010) Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. *Cellulose* **17(3)**: 661 – 669.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., et al. (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279 – 281.

Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews* **55(1)**: 35 – 58.

Ruka, D. R., Simon, G. P., Dean, K. M. (2014) Bacterial cellulose and its use in renewable composites. U: Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications. Thakur, V. J., ur., Scrivener Publishing, str. 95–97.

Sani, A., Dahman, Y. (2010) Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **85(2)**: 151 – 164.

Schubert S, Schlufte K, Heinze T. (2011) Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications, Popa, V., ur., Smithers, str. 1 – 55.

Serafica, G., Mormino, R., and Bungay, H. (2002) Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 756 – 760.

Serafica, G. C., (1997), Ph.D. Thesis, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY

Sheykhnazaria, S., Tabarsaa, T., Ashorib, A., Shakeric, A., Golalipourd, M. (2011) Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers* **86**: 1187– 1191.

Shoda, M., Sugano, Y. (2005) Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10(1)**: 1 – 8.

Shi, Q. S., Feng, J., Li, W. R., Zhou, G., Chen, A. M., Ouyang, Y. S., Chen, Y. B. (2013) Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter intermedius* BC-41. *Cellulose Chemistry and Technology*. **47**: 503 – 508.

Somerville, C. (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**: 53 – 78.

Song, H.-J., Li, H., Seo, J.-H., Kim, M.-J., Kim, S.-J. (2009) Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean Journal of Chemical Engineering* **26(1)**: 141 – 146.

Sugiyama, J., Harada, H., Fujiyoshi, Y., Uyeda, N. (1985) Lattice images from ultrathin sections of cellulose microfibrils in the cell wall of *Valonia macrophysa* Kütz. *Planta* **166(2)**: 161 – 168.

Sun, D., Zhou, L., Wu, Q., Yang, S. (2007) Preliminary research on structure and properties of nano-cellulose. *Journal of Wuhan University of Technology – Materials Science Edition* **22(4)**: 677 – 680.

Sutherland, I. W. (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* **11(9)**: 663 – 674.

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.

Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E., Kawamura, Y. (1997) Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation Bioengineering* **84**: 228 – 231.

Ullah, H., Santos, H. A., Khan, T. (2016) Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose* **23**: 2291 – 2314.

Vitta, S., Thiruvengadam, V. (2012) Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. *Current Science Bangalore* **102(10)**: 1398 – 1405.

Wang, S. S., Han, Y. H., Chen, J. L., Zhang, D. C., Shi, X. X., Ye, Y. X., Chen, D. L., Li, M. (2018) Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers* **9**: 963 – 971.

Wanichapichart, P., Taweepreeda, W., Nawae, S., Choomgan, P., Yasenchak, D. (2012) Chain scission and anti fungal effect of electron beam on cellulose membrane. *Radiation Physics and Chemistry* **81(8)**: 949 – 953.

White, D. C. (1984) Chemical characterization of films. *Life Sciences* **31**: 159 – 176.

White, D., Brown Jr, R., Schuerch, C. (1989) Cellulose and wood chemistry and technology. Schuerch, C., (ur.), John Wiley & Sons, Inc., str. 573 – 590.

Wu, Q., Henriksson, M., Liu, X., Berglund, L. A. (2007) A high strength nanocomposite based on microcrystalline cellulose and polyurethane. *Biomacromolecules* **8(12)**: 3687 – 3692.

Wu, S. C., Lia, Y. K. (2008) Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **54**: 103 – 108.

Wu, R.-Q., Li, Z.-X., Yang, J.-P., Xing, X.-H., Shao, D.-Y., Xing, K.-L. (2010) Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *acetobacter xylinus* strain. *Cellulose* **17(2)**: 399 – 405.

Wu, S., Li, M., Fang, B., Tong, H. (2012) Reinforcement of vulnerable historic silk fabrics with bacterial cellulose film and its light aging behavior. *Carbohydrate Polymers* **88(2)**: 496 – 501.

Wu, J., Zheng, Y., Wen, X., Lin, Q., Chen, X., Wu, Z. (2014) Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation in vitro and in vivo. *Biomedical Materials* **9**: 1 – 12.

Yan, Z., Chen, S., Wang, H., Wang, B., Jiang, J. (2008) Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydrate Polymers* **74**: 659 – 665.

Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. R., Kim, Y. S. (1998) Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85(3)**: 312 – 317.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N., Watanabe, K. (1997) Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61(2)**: 219 – 224.

Yoshino, T., Asakura, T., Toda, K. (1996) Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **81**: 32 – 36.

Zaar, K. (1979) Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*. *Journal of Cell Biology* **80(3)**: 773 – 777.

Zhang, W., Chen, S., Hu, W., Zhou, B., Yang, Z., Yin, N., Wang, H. (2011a) Facile fabrication of flexible magnetic nanohybrid membrane with amphiphobic surface based on bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* **86(4)**: 1760 – 1767.

Zhang, X., Chen, W., Lin, Z., Shen, J. (2011b) Photocatalytic degradation of a methyl orange wastewater solution using titanium dioxide loaded on bacterial cellulose. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* **41(9)**: 1141 – 1147.

Zhang, L., Liu, Z., Cui, G., Chen, L. (2015) Biomass derived materials for electrochemical energy storages. *Progress in Polymer Sciences* **43**: 136 – 164.

Zhijiang, C., Guang, Y. (2011) Bacterial cellulose/collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Sciences* **120**: 2938 – 2944.

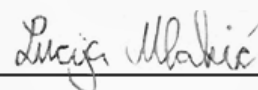
Zhou, L. L., Sun, D. P., Hu, L. Y., Li, Y. W. and Yang, J. Z. (2007) Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 483 – 489.

Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Römling, U. (2003) Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity* **71(7)**: 4151 – 4158.



## 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.*



ime i prezime studenta