

# Proizvodnja nanoceluloze iz lignocelulznih sirovina: Dosadašnje spoznaje i budući aspekti

---

Drdić, Maria

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:038980>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Maria Drdić**

**7877/BT(0058216347)**

**PROIZVODNJA NANOCELULOZE IZ  
LIGNOCELULOZNIH SIROVINA: DOSADAŠNJE  
SPOZNAJE I BUDUĆI ASPEKTI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biokemijsko inženjerstvo

**Mentor:** Prof. dr. sc . Tonči Rezić

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Proizvodnja nanoceluloze iz lignoceluluznih sirovina: Dosadašnje spoznaje i budući aspekti**

**Maria Drdić, 0058216347**

**Sažetak:** Nanoceluloza je prirodan i biorazgradivi materijal dobiven iz obnovljivih lignoceluloznih sirovina kao što su drvena biomasa, poljoprivredni ostaci i ostaci iz proizvodnje celuloze i papira. Izuzetna fizikalno-kemijska svojstva omogućavaju primjenu u proizvodnji materijala posebnih svojstava i primjenu u medicini, farmaceutskoj industriji, proizvodnji papira i konstrukcijskih materijala. Ipak, do sada je skup i zahtjevan proces proizvodnje uz korištenje kiselina i intenzivni mehanički tretman ograničavao širu primjenu nanoceluloze. Danas se istražuju novi postupci proizvodnje nanoceluloze korištenjem novih tehnologija, a s ciljem smanjenog utroška energije i proizvodnje nanoceluloze naprednih svojstava. Svojstva nanoceluloze vezana su uz vrstu i zastupljenost funkcionalnih skupina na površini koje određuju svojstva i primjenu nanoceluloze. U ovom radu bit će opisane metode proizvodnje različitih vrsta nanoceluloze iz lignoceluloznih sirovina kao i utjecaj pojedine metode na fizikalno-kemijska svojstva nanoceluloze. Posebno će biti prikazane biotehnološke metode proizvodnje korištenjem mikrobnih stanica i enzima.

***Ključne riječi:*** *biotehnološka proizvodnja, enzimi, fizikalno-kemijska svojstva, nanoceluloza*

**Rad sadrži:** 28 stranica, 3 slike, 0 tablica, 86 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000**

**Zagreb Mentor: Prof. dr. sc. Tonči Rezić**

**Datum obrane:** 9. rujna 2021.

## 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 and Malting and**  
**Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Production of nanocellulose from lignocellulosic raw materials: Current knowledge and**  
**future aspects**  
**Maria Drdić, 0058216347**

**Summary:** Nanocellulose is a natural and biodegradable material obtained from renewable lignocellulosic raw materials such as wood biomass, agricultural residues and residues from pulp and paper production. Its exceptional mechanical properties enable it to be used in the production of specific materials and applications in medicine, pharmaceutical industry, paper and construction materials. However, until now, a complex and demanding process of production using acid and intensive mechanical processing has limited its wider application of nanocellulose. New methods of nanocellulose production are being explored using new technologies with the aim of reducing energy consumption and obtaining advanced nanocellulose properties. The nanocellulose properties are related to the type and representation of functional groups on the surface determine the properties and application of nanocellulose. This thesis will describe the methods of nanocelluloses production from lignocelluloses biomass as well as the influence of an individual method on the physico-chemical properties of nanocellulose. In particular, biotechnological production methods will be presented using microbial cells and enzymes.

**Key words:** *biotechnological production, enzymes, nanocellulose, physico-chemical properties*

**Thesis contains:** 28 pages, 3 figures, 0 tables, 86 references, 0 supplements

**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:** Prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Defence date:** September 9<sup>th</sup>, 2021

## **Sadržaj**

1.	<i>Uvod</i> .....	1
2.	<i>Predtretman lignoceluloznih sirovina i proizvodnja nanoceluloze</i> .....	2
2.1.	<i>Mehanički i fizikalni predtretman</i> .....	4
2.2.	<i>Kemijski predtretman</i> .....	6
2.3.	<i>Enzimski predtretman</i> .....	7
3.	<i>Kemijske modifikacije nano(celuloze)</i> .....	9
3.1.	<i>Kemijske modifikacije OH-skupina (nano)celuloze</i> .....	10
3.2.	<i>Kemijske modifikacije piranoznog prstena glukana</i> .....	11
3.3.	<i>Post-modifikacije nanoceluloze</i> .....	13
4.	<i>Bakterijska nanoceluloza (BNC)</i> .....	15
4.1.	<i>Svojstva i primjena BNC</i> .....	16
4.2.	<i>Funkcionalizacija bakterijske nanoceluloze</i> .....	17
4.3.	<i>Optimizacija- budući aspekti i izazovi</i> .....	18
5.	<i>Zaključak</i> .....	21
	<b>Popis literature</b> .....	<b>22</b>

## 1. Uvod

Celuloza je polimer koji se u prirodi pronalazi kao sastavni dio stanične stijenke biljaka, ali i u brojnim bakterijskim vrstama i algama. Mehaničkim tretmanima ili kemijskom modifikacijom celuloznih materijala odnosno uzgojem bakterija roda *Gluconobacter*, moguće je proizvesti nanocelulozu. Prema definiciji, nanoceluloza je materijal celuloznog podrijetla s najmanje jednom dimenzijom u nanometarskoj veličini [Nechyporchuk i sur., 2016].

Značajne karakteristike nanoceluloze, kao što su velika površina, hidrofilnost i visoki stupanj kristaliničnosti i čistoće, posljedica su načina prerade, proizvodnje i fenomena vezanih uz čestice nanometarske veličine. Osim navedenih, nanocelulozu karakterizira i velika aksijalna krutost (do 130 GPa), veliki omjer širine i visine nanočestica (od 10 do 100), mala gustoća (približno 1,5 g / cm<sup>3</sup>) i niska vrijednost koeficijenta toplinskog širenja (približno 1 ppm / K). Ova svojstva koriste se u proizvodnji kompozitnih materijala poboljšanih svojstava [Borjesson i sur., 2015]. Također, očekuje se da će se primjenom različitih postupaka (pred)tretmana celuloze i modifikacijama nanoceluloze omogućiti proizvodnja nanoceluloze naprednih svojstava [Islam i sur., 2014] kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost i poboljšana mehanička i izolacijska svojstva. Ta svojstva uglavnom ovise o proizvodnom procesu i sastavu lignocelulozne biomase koja se koristi kao ishodišna sirovina [Siqueira i sur., 2010].

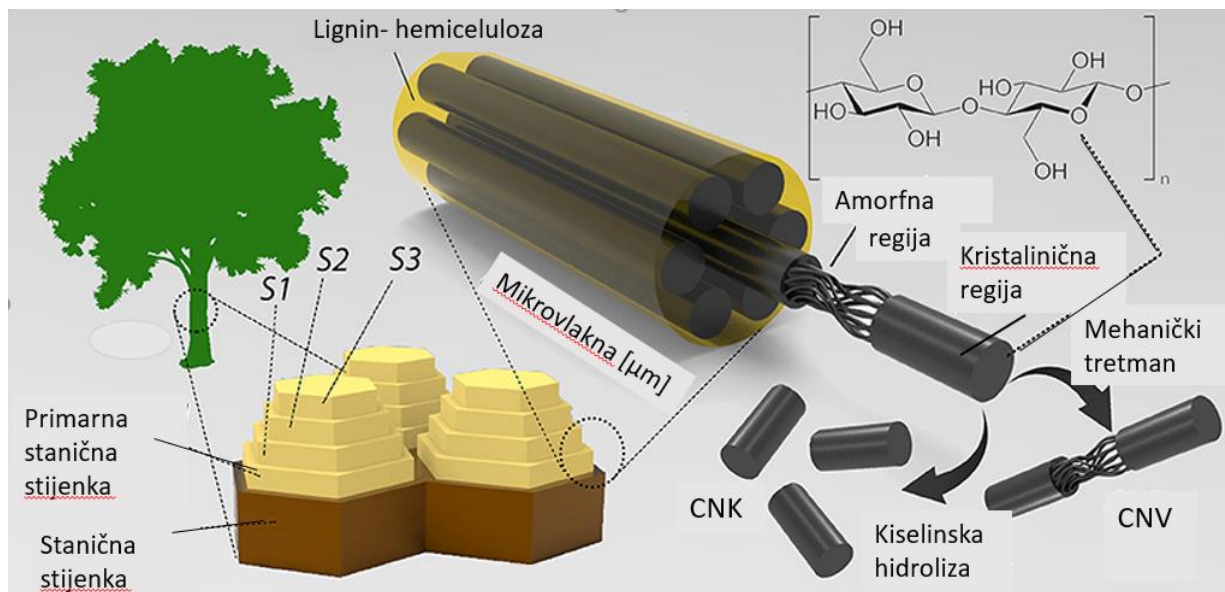
Morfološki gledano postoje tri vrste nanoceluloze koje se mogu proizvesti: (a) celulozna nanovlakna (CNV), dobivena enzimskim i/ili fizikalno-kemijskim procesom dezintegracije; (b) nanokristalna celuloza (CNK), koja se dobiva primjenom koncentriranih anorganskih kiselina kao što su HCl ili H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Klemm 2011]; i (c) bakterijska nanoceluloza, sintetizirana od strane bakterija *Gluconoacetobacter xylinus*. U ovom preglednom radu opisane su metode i tehnike proizvodnje CNV-a, celuloznih nanokristala (CNK) i bakterijske nanoceluloze (BNC) iz lignocelulozne biomase kao i mogućnosti modifikacija (nano)celuloze s ciljem proizvodnje materijala željenih svojstva i visoke dodane vrijednosti.

## *2. Predtretman lignocelulozних sirovina i proizvodnja nanoceluloze*

Lignocelulozna biomasa je kompleksna struktura sastavljena od lignina (15-30%), hemiceluloze (20 do 50%) i celuloze (40 do 50%) [Arora i sur., 2020]. Iako je, zbog neophodnog predtretmana, tehnološki značajno zahtjevnija sirovina za primjenu u industriji, lignocelulozna sirovina je jeftinija u usporedbi sa sirovinama prve generacije poput melase, glukoze ili škroba. Dostupna je iz poljoprivrednog i šumarskog sektora. Lignocelulozna biomasa se kao otpad iz poljoprivrednog i šumarskog sektora nakuplja u velikim količinama, koje mogu doseći i do  $50 \times 10^9$  tona godišnje. [Kuhad i sur., 1993] te se njezinim korištenjem u industrijskoj proizvodnji, a tako i u proizvodnji nanoceluloze drži do načela održivog razvoja. Celuloza je linearni homopolimer sastavljen od  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom te ključna komponenta lignocelulozne biomase jer se njezinim tretmanom dobiva celuloza nanometarske razine, tj. proizvodi nanoceluloza. S ciljem što boljeg izdvajanja celuloze, prvi korak u proizvodnji nanoceluloze je predtretman koji uključuje uklanjanje lignina i hemiceluloze [Nechyporchuk i sur., 2016]. Lignin čini u vodi netopljivu barijeru, a hemiceluloza obavlja celulozna vlakna, pa su njihovim uklanjanjem celulozna vlakna dostupnija mehaničkom odnosno kemijskom tretmanu. Razlikujemo dvije vrste struktura unutar celuloze: amorfnu i kristaliničnu, a udio i omjer navedenih struktura ovisi o podrijetlu lignocelulozne biomase. Amorfni dijelovi celuloze podložniji su djelovanju anorganskih kiselina odnosno enzimskoj hidrolizi, pa se uklanjanjem tih struktura oslobađaju dijelovi celuloze s kristaliničnom strukturom čijim se daljnjim tretmanom mogu proizvesti nanokristali celuloze (CNK). Na Slici 1 shematski su prikazani amorfni i kristalinični dijelovi lignocelulozne sirovine i učinak mehaničkog odnosno kemijskog tretmana.

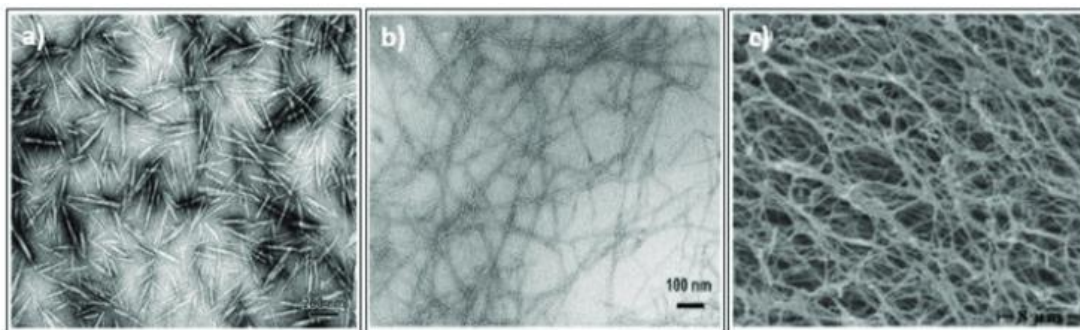
Visoki utrošak energije tijekom kemijsko-mehaničkog tretmana ograničava primjenu nanoceluloze. Stoga su se posljednjih godina razvijaju novi postupci proizvodnje nanoceluloze korištenjem energetski učinkovitijih fizikalnih, kemijskih i enzimskih metoda [Naderi i sur., 2015]. Ovisno o korištenoj metodi predtretmana, moguće je dobiti nanocelulozu različitih svojstava i odrediti mogućnost primjene. U ovom poglavlju dan je pregled istraživanja postupaka proizvodnje nanoceluloze korištenjem fizikalnih, kemijskih i bioloških metoda. Osim navedenih triju metoda, kombinacija različitih vrsta predtretmana rezultira učinkovitijom razgradnjom kompleksne strukture lignocelulozne biomase. Kombinacija enzimskog i fizikalnog predtretmana pulpe drva rezultira proizvodnjom nanovlakana s većim omjerom širine i dužine te većom molekulskom masom u usporedbi s nanovlakanimi dobivenih nakon predtretmana kiselinama [Henriksson i sur.,

2007]. Ova vrsta predtretmana ekološki je prihvatljivija i ne zahtjeva upotrebu toksičnih i korozivnih kemikalija koje se uobičajeno koriste u predtretmanima kiselinama. Enzimska hidroliza rezultira značajnim smanjenjem stupnja polimerizacije celuloze, a takvom se depolimerizacijom pospješila proizvodnja celuloznih nanovlakana fizikalnim predtreatmentom [Rollin i sur., 2011]. Kao što je spomenuto u Uvodu, osim nanoceluloznih vlakana, nanokristala celuloze, razlikujemo još i bakterijsku nanocelulozu, a mikroskopske slike tih triju vrsta nanoceluloze prikazane su na Slici 2. Za proizvodnju bakterijske nanoceluloze također se kao sirovina može koristiti lignocelulozna sirovina, kao alternativa skupim supstratima koji služe kao hranjivi medij za uzgoj bakterije roda *Gluconobacter*, o čemu će više biti riječ u poglavlju 4.



Slika 1: Građa lignoceluloznih sirovina [Dias i sur., 2020]





*Slika 2: Usporedba mikroskopske slike: (a) nanokristalne celuloze, (b) celuloznih nanovlakana i (c) bakterijske nanoceluloze [Nazrin i sur., 2020]*

### *2.1. Mehanički i fizikalni predtretman*

Mehaničkim tj., fizikalnim predtretmanom celuloznih vlakana moguće je proizvesti i izdvojiti mikrocelulozna (MCV) odnosno nanocelulozna vlakna (NCV). Djelovanjem mehaničke sile duž osi celuloznih vlakana [Cheng i sur., 2009] dolazi do slabljenja i pucanja vodikovih veza između vlakana, a time se dimenzije celuloznih vlakana reduciraju do dužine od nekoliko mikrometara, a širine od deset do nekoliko stotina nanometara. Dimenzije i morfološke karakteristike na ovaj način dobivenih mikro/nanoceluloznih vlakana ovisi o svojstvima celuloze odnosno upotrijebljene lignocelulozne sirovine. Celulozna nanovlakna (CNV) se zbog svojih mehaničkih svojstava i velike površine mogu koristiti kao modifikatori reoloških svojstava u polimernim kompozitima i hidrogelovima za proizvodnju superkondenzatora, biosenzora i fleksibilnih prozirnih displeja te kao ekološki prihvatljiva alternativa za plastiku u zrakoplovima, automobilima, građevinskom materijalu i drugim proizvodima, a zbog biokompatibilnosti se omogućava korištenje u biomedicini [Dumanli, 2017]. Istraživanja su pokazala da fizikalnim tretmanom primarne stanične stijenke biljaka nastaju tanja i dulja nanovlakna u usporedbi sa istim tretmanom sekundarne stanične stijenke. Osim toga, CNV ima veći omjer duljine i promjera te veću površinu s većim brojem hidroksilnih skupinama što ih čini pogodnijima za daljnju modifikaciju za razliku od celuloznih nanokristala. Priprema nanovlakana fizikalnim tretmanom obično se provodi pomoću tri glavne tehnologije: homogenizacijom pomoću Manton-Gaulin homogenizatora, mikrofluidizacijom [Rol i sur., 2019] te mikromljevenjem, ali se koriste još i ekstruzija, kriomljevenje, ultrazvučni tretman visokog intenziteta, tretman mikrovalovima, tretman parom pod visokim tlakom i parna eksplozija.

Neke od navedenih metoda bit će opisane u nastavku poglavlja. Celulozna nanovlakna proizvodi nekoliko tvrtki kao npr. Daicel u Japanu i Rettenmaier u Njemačkoj. Proizvodnja se temelji na mehaničkim metodama obrade i korištenju mlinova, homogenizatora i ekstrudera [Siró i Plackett, 2010].

Homogenizacija pod visokim tlakom učinkovita je metoda za usitnjavanje celuloznih vlakna, a jednostavna je jer ne uključuje dodatak kemikalija [Keerati-U-Rai i Corredig, 2009]. Tijekom ovog postupka vodena suspenzija celulozne pulpe propušta se kroz vrlo usku mlaznicu pri visokom tlaku koji može doseći i preko 150 MPa [Nakagaito i Yano, 2004]. Prolaskom suspenzije kroz mlaznicu i djelovanjem smičnih sila i tlaka dolazi do usitnjavanja vlakana celuloze na mikro- i nanometarsku razinu [Naderi i sur., 2015]. Homogenizacija pod visokim pritiskom koristi se za proizvodnju nanovlakana iz različitih sirovina, poput pulpe šećerne repe i ostataka pulpe nakon prerade voća [Habibi i sur., 2009]. Valja naglasiti da korištenje visoko-tlačnog homogenizatora za proizvodnju nanoceluloze donosi i neke nedostatke, od čega valja naglasiti da je potrebno provesti zadovoljavajuće usitnjavanje sirovina kako ne bi došlo do začepljenja homogenizatora [Jonoobi i sur., 2010]. Jedan od najčešće korištenih visoko-tlačnih homogenizatora je Manton-Gaulin homogenizator.

Kriomljevenje je metoda tijekom koje se korištenjem tekućeg dušika celulozni supstrati zamrzavaju te se nakon zamrzavanja djelovanjem visokih smičnih i udarnih sila narušava struktura celuloznih vlakana pri čemu dolazi do usitnjavanja [Chakraborty i sur., 2005]. Tijekom djelovanja udarnih i smičnih sila dolazi do stvaranja pritiska zamrznutih kristala vode, pucanja celuloznih vlakana i oslobađanja mikrofibrila celuloze, a dodatnim djelovanjem sila na mikrofibrile dolazi do usitnjavanja na nanometarsku razinu [Wang i Sain, 2007]. Kontrolom parametara tijekom kriomljevenja dobivena su nanovlakna s promjerima od 5 do 80 nm. Ultrazvuk je dio zvučnog spektra u intervalu od 20 KHz na 10 MHz. Sonda koja generira ultrazvuk pretvara mehaničku ili električnu energiju u ultrazvučne valove visokog intenziteta, a apsorpcijom ultrazvučnih valova visokog intenziteta u kapljevinama dolazi do vrlo jakih mehaničkih oscilacija (kavitacije), što je fizikalni fenomen koji uključuje formiranje, ekspanziju i imploziju mikroskopskih mjehurića plina. Tijekom implozije, u neposrednom okružju kavitacijskih mjehurića, nastaju snažni udarni valovi koji proizvode lokalne temperature i do 5000 °C i tlakove veće od 500 atm. Sve navedene karakteristike čine tretman ultrazvukom idealnim za procese stvaranja emulzija, homogenizaciju, cijepanja i disagregacije materijala [Abramov, 1998]. Ako se ultrazvuk visokog intenziteta primjeni na vodenu suspenziju celuloze prilikom predtretmana, moguće je dobiti

mikrocelulozna i nanocelulozna vlakna. Prilikom predtretmana potrebno je obratiti pozornost na primijenjenu snagu sonde pri čemu je učinkovitije usitnjavanje postignuto primjenom sonde veće snage jer se u tom slučaju temperatura brže povećavala. Korištenjem celuloznih vlakana veće duljine dobivene su suspenzije s manjim udjelom celuloznih vlakana nanometarskih dimenzija [Wang i Cheng, 2009], zbog čega se preferira korištenje više različitih metoda predtretmana. Mehanički postupci najčešće se koriste za proizvodnju nanoceluloze, ali su zbog velike potrošnje električne energije nepovoljni, a neučinkoviti zbog nezadovoljavajućih svojstava dobivenih materijala povezanih uz homogenost i raspodjelu nanoceluloze u polimernim kompozitima [Naderi i sur., 2015]. Također, dobivene vodene suspenzije nanoceluloze nakon mehaničkih tretmana imaju nizak udio čvrste tvari (do 5%), a troškovi transporta većih količina suspenzije visoki [Rol i sur., 2019]. U svrhu smanjivanja utroška energije i optimiranje procesa proizvodnje nanoceluloze proveden je niz istraživanja proizvodnje nanoceluloze korištenjem kemijskih i enzimskih predtretmana, što će biti opisano u sljedećim poglavljima.

## *2.2. Kemijski predtretman*

Kemijski predtretman je vrsta obrade lignocelulozne biomase korištenjem kemikalija čijim se djelovanjem uklanjaju lignin i hemiceluloza vezanih na površini celuloznih vlakana. Nakon njihovog uklanjanja, kemikalije lako prodiru u amorfne dijelove celuloze [Zhu i Pan, 2010] i hidroliziraju ih, čime se oslobađaju kristalinični dijelovi strukture. Modifikacijom kristaliničnih dijelova zatim se mogu proizvesti nanokristali celuloze (CNK). Kemikalije koje se najčešće koriste za predtretman lignocelulozne biomase su lužine i kiseline pa će u nastavku biti opisani alkalni predtretman odnosno kiselinska hidroliza.

### *2.2.1 Alkalni predtretman*

Alkalni predtretman podrazumijeva korištenje alkalnih otopina, tj. lužina kao što su NaOH i  $\text{Ca(OH)}_2$  u svrhu modifikacije strukture i sastava korištene lignocelulozne sirovine [Cheng i sur., 2008]. Rezultat korištenja alkalnih otopina je uklanjanje lignina, hemiceluloze i preostalih pektina. Za delignifikaciju tijekom predtretmana odgovorni su hidroksilni ioni. Budući da je lignin heteropolimer te sadrži razne spojne i strukturne elemente koji imaju drukčiju stabilnost, učinak alkalnog tretmana na strukturu lignina je složen i teško se definiraju uvjeti tretmana. Tijekom procesa delignifikacije može doći i do nastanka nepoželjnih nusproizvoda poput metanola i formaldehida [Fengel i Wegener, 1984]. Uvjeti tijekom alkalnog predtretmana moraju se pažljivo

kontrolirati kako bi se izbjegla neželjena razgradnja celuloze i osiguralo provođenje hidrolize na površini vlakana.

### *2.2.2 Kiselinska hidroliza*

Kiselinska hidroliza jedna je od najučinkovitijih metoda za predtretman lignoceluloznih sirovina zbog mogućnosti cijepanja glikozidnih veza hemiceluloze, a i za proizvodnju celuloznih nanokristala iz čisto dobivenog celuloznog materijala. Tijekom hidrolize potrebno je kontrolirati parametre kao što su temperatura, način miješanja i vrijeme trajanja hidrolize [Rol i sur.,2017]. Osobito bitna značajka je vrijeme hidrolize jer se predugim djelovanjem kiseline može postići potpuna razgradnja celuloze, što se nastoji izbjeći, dok će prekratko vrijeme hidrolize proizvesti velika nedispergirana vlakna i celulozne agregate. Uspješnost hidrolize i svojstva dobivenih nanokristala celuloze ovisi i o upotrijebljenoj kiselini. Najčešće se koristi sulfatna kiselina i bromidna kiselina, a također se koristi kloridna i fosfatna kiselina. Sulfatna i fosfatna kiselina reagiraju s površinskim hidroksilnim skupinama celuloze dajući površine zasićene fosfatnim ili sulfatnim esterima koji pospešuju spontanu disperziju celuloznih nanokristala u vodi. Ovisno o podrijetlu celuloze i vrsti korištene kiseline, omjeri dužine i širine nanoceluloze se mijenjaju. Ipak, za većinu predtretmana kiselinama i lužinama izmjerene su dimenzije od nekoliko nanometara širine i dužine od deset nanometara do nekoliko mikrometara. Iako je vrlo učinkovita metoda, kiselinski predtretman ima i neke nepoželjne osobine. Tako se zbog korozivnog djelovanja kiselina na opremu mora koristiti skuplji materijal što u krajnosti povećava investicijske troškove. Također, tijekom hidrolize nastaju i nepoželjni nusprodukti poput furfurala, a osim toga su veliki i troškovi odlaganja otpadnih voda [Yang i Wyman, 2008]. Djelovanjem kiselina i lužina na celulozne supstrate dolazi do uklanjanja dijela jedinica glukana vezanih  $\beta$ -1-4-glikozidnom i usitnjavanja celuloze na nanometarsku razinu. Također kiseline i lužine reagiraju s hidroksilnim skupinama glukana. Ove reakcije se mogu iskoristiti za modifikaciju i dobivanje nanoceluloze željenih svojstava. Stoga su u Poglavlju 3 opisane metode i mehanizmi kemijskih modifikacija (nano)celuloze.

### *2.3 Enzimski predtretman*

Enzimskim predtretmanom olakšava se razgradnja celuloze i umanjuje utrošak energije za proizvodnju nanoceluloze [Pääkkö i sur., 2007]. Da bi se uspješno razgradila celuloza potrebno je

djelovanje više enzima koje nazivamo celulolitičkim enzimima. Podjela celulolitičkih enzima na celobiohidrolaze, endoglukanaze i egzoglukanaze određuje način odnosno mehanizam njihovog djelovanja. Egzoglukanaze djeluju na celulozni lanac i proizvode disaharide i trisaharide, celobiohidrolaze djeluju na kristalinične regije celuloze i hidroliziraju disaharide i trisaharide u glukozu, a endoglukanaze hidroliziraju amorfne regije celuloze [Zhou i Ingram, 2000]. Općenito, djelovanjem enzima na celulozu dolazi do smanjenja stupnja polimerizacije i povećanja indeksa kristaliničnosti (IK). Smanjenju stupnja polimerizacije osobito doprinosi endoglukanaza [Nechyporchuk i sur., 2015]. Zaključno, za uspješnu enzimsku razgradnju celuloze potrebno je sinergističko djelovanje više celulolitičkih enzima.

S ciljem formulacije enzimskog pripravka koji će osigurati što efikasniju razgradnju celuloze, pa tako i proizvodnju nanoceluloze, napravljen je niz istraživanja [Henriksson i sur., 2007]. Istraživanja su pokazala da djelovanjem endoglukanaze na celulozu dolazi do usitnjavanja celuloze na mikrometarsku razinu. Nakon djelovanja enzima proveden je mehanički tretman pri čemu je potrebna manja primijenjena sila za usitnjavanje celuloze na nanometarsku razinu, a što u konačnici dovodi do uštede energije. Također, proizvedena je nanoceluloza imala uniformniju raspodjelu veličine čestica u usporedbi s nanocelulozom proizvedenom samo djelovanjem mehaničkog tretmana [Pääkkö i sur., 2007].

Slično istraživanje proizvodnje nanoceluloze djelovanjem mehaničkog i enzimskog predtretmana provedeno je u četiri koraka. U prvom koraku korišten je Escher–Wyss homogenizator kako bi se osiguralo što bolje vezanje enzima na mehanički predtretiranu površinu celuloze. U drugom koraku korištena je endoglukanaza, a zatim je tako enzimski predtretirana celuloza ponovno mehanički tretirana. U zadnjem koraku korišten je visokotlačni homogenizator kako bi se proizvela nanoceluloza zadovoljavajućih karakteristika, a uz što manji utrošak energije [Keerati-U-Rai i Corredig, 2009].

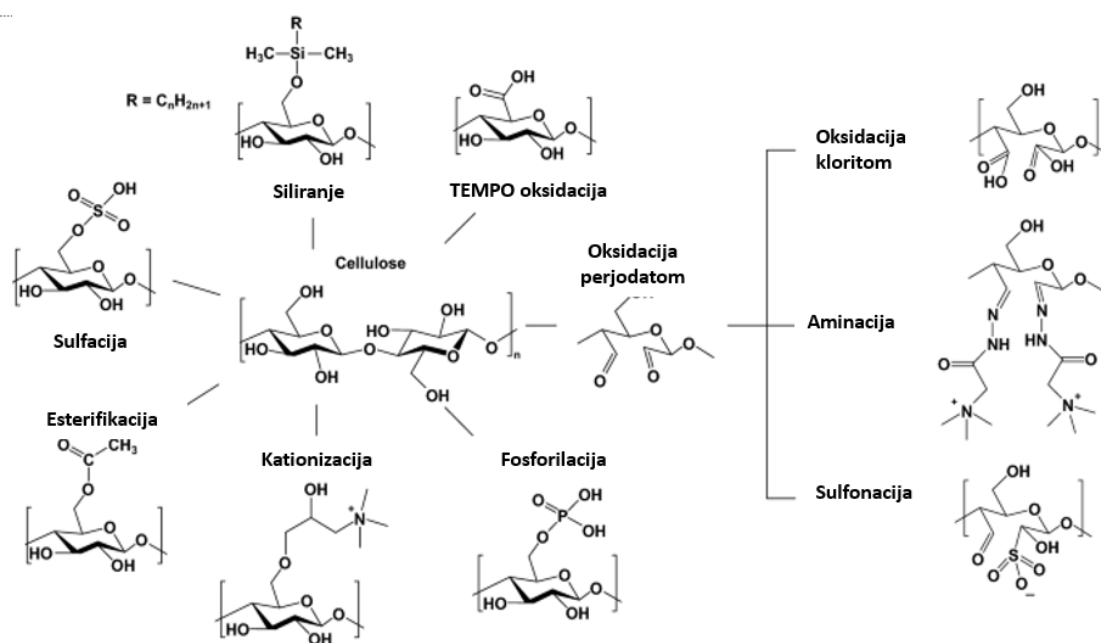
Novija istraživanja ukazuju na povećanje efikasnosti djelovanja endoglukanaza uz prisutnost ksilanaza i litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO). Ovi enzimi prije svega djeluju kao „pomoćni“ enzimi tako što povećavaju dostupnost celuloze za djelovanje celulolitičkih enzima, pri čemu LPMO djeluje na kristalinične dijelove celuloze, a ksilanaze selektivno uklanjaju površinski ksilan i djeluju sinergistički s celulazama što posljedično dovodi do povećanja poroznosti i olakšavanja fibrilacije u celulozna nanovlakna [Henriksson i sur., 2007].

Enzimska hidroliza celuloze odvija se u blagim uvjetima zbog čega je potrebno duže vrijeme za efikasnu razgradnju u usporedbi s procesom kiselinske hidrolize. Zbog toga se enzimska hidroliza

najčešće kombinira s drugim metodama kao što su mehaničke metode predtretmana [Moniruzzaman i Ono, 2013].

### 3. Kemijske modifikacije nano(celuloze)

Veliki broj hidroksilnih skupina na površini (nano)celuloze omogućuje modifikaciju kemijskim putem. Cilj kemijske modifikacije površine je povećanje reaktivnosti skupina i priprema za uvođenje novih funkcionalnih skupina procesom post-modifikacije u kasnijoj fazi proizvodnje nanoceluloznih vlakana, a u svrhu poboljšanja svojstava i povećanja mogućnosti primjene nanoceluloznih vlakana. Posljedica velikog broja hidroksilnih skupina je i generiranje velikog broja vodikovih veza između nanofibrila, zbog čega se troši značajna količina energije za nanofibrilaciju. Kemijskim modifikacijama omogućeno je uvođenje negativnog naboja na površine čime se smanjuje broj vodikovih veza što u konačnici dovodi do smanjenja utroška energije za nanofibrilaciju [Rol i sur., 2019]. U nastavku je opisan postupak kemijske modifikacije hidroksilnih skupina i piranoznog prstena glukana, a na Slici 3 su shematski prikazane funkcionalne skupine koje nastaju najčešćim kemijskim modifikacijama.



Slika 3: Kemijske modifikacije (nano)celuloze [Tavakolian i sur., 2020]

### 3.1. *Kemijske modifikacije OH-skupina (nano)celuloze*

Odabir metode za modifikacije kemijskim putem ovisi najprije o strukturnim obilježjima nanoceluloze kao što su reaktivnost i broj hidroksilnih skupina na površini. Svaka monomerna jedinica sadrži hidroksilne skupine na položajima 2, 3 i 6, s time da je hidroksilna skupina na položaju 6 ugljika konjugirana metilnom skupinom što je čini reaktivnijom. Prilikom modifikacije je vrijeme reakcije nanoceluloze s kemijskim reagensom bitan faktor. Produžavanjem reakcijskog vremena dolazi do promjena u unutrašnjosti nanokristala pri čemu se narušava kristalna struktura i smanjuje kristaliničnost. Promjene u unutrašnjosti nanokristala imaju negativan utjecaj na funkcionalna svojstva nanoceluloze. Stoga je za uspješnu modifikaciju potrebno odabrati optimalno vrijeme i uvjete reakcije pri kojima će biti modificiran najveći broj funkcionalnih OH-skupina bez narušavanja kristalne strukture. Također, kod ovakvih reakcija, potrebno je obratiti pozornost i na oslobađanje topline koja također narušava kristalnu strukturu odnosno potrebno je provoditi modifikacije u kontroliranim uvjetima. Iz navedenog primjera vidljivo je da, uz reakcije vezane uz OH-skupine, kemijske modifikacije mogu djelovati i na „piranozni prsten“.

Jedan od načina uvođenja negativnog naboja na površinu celuloze jest TEMPO posredovana oksidacija. Kratica TEMPO označava 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal pomoću kojega se hidroksilne skupine u vodenom mediju u prisustvu NaOCl i NaBr oksidiraju u karboksilne skupine [Habibi, 2014]. Oksidacija se provodi u lužnatim uvjetima u kojima karboksilne skupine imaju negativan naboj pa se među celuloznim vlaknima stvaraju odbojne elektrostatske sile koje olakšavaju razdvajanje. Tako se jednostavnom mehaničkom dezintegracijom mogu dobiti nanovlakna širine 3 do 4 nm [Iwamoto i sur., 2010], a također je pokazano da je celuloza dobivena TEMPO posredovanom oksidacijom zadržala željeni stupanj polimerizacije i uniformnu raspodjelu promjera vlakana.

S ciljem povećanja broja negativnih naboja na površini nanoceluloze, također su primijenjene i neke od metoda koje su se i prije koristile tijekom proizvodnje celuloze kao što su: karboksimetilacija, fosforilacija, oksidacija perjodatom i sulfoniranje.

Zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti nastajanja proizvoda s brojim obećavajućim svojstvima, karboksimetilacija polisaharida, a tako i celuloze, jedna je od proučavanijih metoda konverzije površinskih skupina. Ovim tretmanom se najprije celuloza aktivira najčešće pomoću NaOH, a zatim dolazi do konverzije pomoću kloroctene kiseline [Heinze i Koschella, 2005]. Karboksimetilacijom je ostvaren visok stupanj fibrilacije nanoceluloze i zadovoljavajuća uniformnost dimenzija vlakana

[Aulin i sur., 2009]. Međutim, nedostatak ove metode očituje se u korištenju toksičnih kemikalija i u tome što su dobivena nanovlakna celuloze hidrofilnija nakon ovog tretmana što može biti ograničavajući faktor prilikom njihovog korištenja u nepolarnim medijima [Habibi, 2014].

Fosforilacija je opisana u svega tri znanstvena rada [Rol i sur., 2019], a istraživanja su pokazala da primjena različitih soli fosfata s nižom vrijednošću konstante topljivosti ( $K_s$ ) pozitivno utječe na povećanje broja naboja i svojstava ovako modificirane (nano)celuloze. Fosforilacija predstavlja alternativu metodi TEMPO posredovane oksidacije, a prednost ovog postupka je u njegovoj jednostavnosti i ekološkoj prihvatljivosti. Ipak je potrebno napraviti dodatna istraživanja kako bi se razjasnili mehanizmi djelovanja i učinci različitih fosfata i njihovih soli na promjene broja naboja ovako modificirane nanoceluloze te optimirao proces modifikacije [Noguchi i sur., 2017].

Do sada opisani postupci modifikacije osiguravaju smanjenje utroška energije i dobivanje novih svojstava. Ipak nanoceluloza proizvedena na ovaj način zbog povećanja broja naboja pokazuje smanjenu stabilnost pri promjeni pH vrijednosti i ionske jakosti. Stoga je nedavno primijenjen postupak sulfoniranja kojim je, zbog niske pKa vrijednosti sulfoniranih skupina ostvarena bolja stabilnost materijala [Jowkarderis i van de Ven, 2014]. Usporedbom svojstava nanoceluloze modificirane sulfoetilacijom i nanoceluloze modificirane postupkom karboksimetilacije, dobivena je slična morfologija i stupanj polimerizacije, ali je sulfoetilacijom povećano zadržavanje vode i smanjena kristaliničnost. Nadalje, povećana je količina nanovlakana celuloze za 50 % te je ostvarena bolja stabilnost i disperzija nanovlakana [Zhang i sur., 2011].

Broj naboja na površini nanoceluloze može se povećati oksidacijom, ali se također može provesti modifikacija s ciljem dobivanja pozitivno nabijene nanoceluloze. Postupak se može provoditi direktno ili nakon modifikacije nanoceluloze perjodatom. Istraženi su različiti postupci djelovanja klor-kolin-klorida i DMSO-a na nanocelulozu te je povećanjem pozitivnih naboja nakon modifikacije dobivena nanoceluloza s boljim mehaničkim i antimikrobnim svojstvima. Stoga je ovako modificirana nanoceluloza pronašla primjenu u proizvodnji materijala naprednih svojstava u tekstilnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji [Ho i sur., 2011].

### *3.2. Kemijske modifikacije piranoznog prstena glukana*

Poznati postupak za modifikacije piranoznog prstena glukana u celulozi je oksidacija perjodatom u kojoj dolazi do oksidacije hidroksilnih skupina na položajima 2 i 3 u aldehidne skupine i pucanja kovalentne C-C veze. Na taj su način formirane aldehidne skupine koje mogu poslužiti kao nosač za pričvršćivanje novih funkcionalnih skupina u fazama post-modifikacije nanoceluloze ili za daljnju



oksidaciju u karboksilne skupine [Siller i sur., 2015]. Primjenom oksidacije perjodatom smanjuje se kristaliničnost pri čemu su dobivena fleksibilnija nanovlakna [Kim i sur., 2000]. Reakciju koja je inače dugotrajna, moguće je ubrzati na višim temperaturama ili korištenjem anorganskih katalizatora, a dokazano je da je sadržaj karbonilnih skupina proporcionalan porastu reakcijskog vremena [Larsson i sur., 2014]. Za uspješnu oksidaciju potrebno je prilagoditi parametre poput koncentracije perjodata, temperature [Sirviö i sur., 2011] i vremena reakcije.

Oksidacija perjodatom može se provoditi i u kombinaciji s drugim postupcima kao npr. dodatkom  $\text{NaBH}_4$  ili  $\text{ClO}_2$ , s reakcijama u cilju dobivanja imina ili u kombinaciji sa sulfoniranjem. Oksidacija perjodatom s dodatkom natrijeva klorita ( $\text{NaClO}_2$ ) i homogenizacijom rezultira konverzijom aldehidnih u karboksilne skupine dobivajući dikarboksilnu nanocelulozu. Tako proizvedena nanoceluloza pokazala se kao sredstvo koje uspješno flokulira otpadne vode, a isto tako pokazuje i visoku stabilnost u vodenim suspenzijama tijekom dužeg vremenskog perioda [Suopajärvi i sur., 2013]. Aldehidne skupine nastale oksidacijom perjodatom mogu se dalje reducirati u alkoholne skupine korištenjem natrijevog borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ), a dobivena nanoceluloza pokazala je poboljšana mehanička svojstva [Larsson i sur., 2014].

Uvođenje pozitivnih naboja na površinu celuloze iznimno je kompliciran postupak. Međutim, nakon oksidacije perjodatom aldehidne su skupine reaktivnije i sklonije su nukleofilnoj adiciji primarnim aminom, tj. reakciji Schiffove baze. Celulozna nanovlakna prethodno oksidirana perjodatom, a zatim tretirana iminima imaju poboljšanu mehaničku stabilnost, a adicija aminogvanidina rezultirala je nanovlaknima koja su otporna na mikrobnu razgradnju [Sirviö i sur., 2014].

Sulfoniranje je jedan od načina uvođenja negativnog naboja na površinu nanovlakana, a provodi se tako da se najprije provodi korak oksidacije pomoću natrijevog metaperjodata, nakon čega slijedi reakcija s natrijevim metabisulfitom, a zatim homogenizacija.

Osim oksidacije perjodatom, još postoje brojne druge mogućnosti za dobivanje aldehidnih skupina poput primjene ozona, eutektičkih otapala i imidazola. Od nabrojanih metoda, po brojim kvalitetama najviše se ističe tretman ozonom odnosno ozonoliza, budući da se može koristiti kao alternativa TEMPO posredovanoj oksidaciji. Prednost ozona kao reagensa za modifikaciju jest efektivnost pri stvaranju aldehidnih skupina, a s druge strane niska cijena, jednostavnost i netoksičnost. Osim toga, proučavan je noviji postupak u kojemu se ozon koristi u kombinaciji s celulolitičkim enzimima za proizvodnju nanoceluloze različitih svojstava [Bilodeau i Paradis, 2020]. Nadalje, provedena su istraživanja gdje se osim ozonom, celuloza tretira derivatima lignina, kojima se zbog velike reaktivnosti prema ozonu, pripisuje povećano stvaranje radikala odgovornih za

stvaranje aldehidnih skupina [Tabar i sur., 2017] pa je takvim tretmanom omogućeno stvaranje još većeg broja aldehidnih skupina.

### 3.3. Post-modifikacije nanoceluloze

Dok je cilj predtretmana bio smanjiti utrošak energije, modifikacijama nanoceluloze potrebno je povećati funkcionalnost i omogućiti dobivanje željenih svojstava nanokompozitnih materijala. Zbog svoje hidrofilne prirode, nanoceluloza se ne može jednoliko dispergirati u organskoj hidrofobnoj fazi već tvori agregate i strukture nalik gelovima nakon sušenja [Missoum i sur., 2013]. Radi povećanja kompatibilnosti s matricama hidrofobnih kompozita, ali i dobivanja različitih karakteristika koje će biti ključne za široku primjenu, modificirana nanoceluloza podliježe post-modifikacijama odnosno funkcionalizaciji. Jednostavniji način funkcionalizacije je adsorpcijom, a sve je više u upotrebi i kemijski pristup vezanjem reagenasa kovalentnom vezom za površinu nanoceluloze, a o navedenim metodama bit će riječ u nastavku.

#### 3.3.1. Adsorpcija

Adsorpcijom dolazi do fizičke interakcije između korištenih reagenasa i površine modificirane nanoceluloze. Reagensi koji su najčešće u upotrebi kao adsorbensi su polielektroliti i surfaktanti, a na površinu nanoceluloze se vežu van der Waalsovima interakcijama, vodikovim mostovima ili ionskim interakcijama. Prednost ovog postupka uspoređujući s kovalentnim vezanjem polimera je u tome što se provodi u vodenom, a ne organskom mediju, a uvjeti provođenja reakcije su puno blaži te može se primjenjivati u industrijskom mjerilu. Tako se ova metoda već stoljećima koristi u industriji papira i celuloze [Hatton i sur., 2015].

Surfaktanti su amfifilne tvari što znači da imaju i hidrofobni i hidrofilni dio molekule, a to ih svojstvo čini površinski aktivnim tvarima. Istraživanja adsorpcije ksiloglukana i galaktoglukomanana kao surfaktanata provedena su s ciljem povećanja hidrofobnosti i adsorpcijskih svojstava nanoceluloze. Drugi način modifikacije je adsorpcija polielektrolita koji često imaju veliku količinu naboja pa se najčešće vežu ionskim interakcijama. Kationski polielektroliti se već koriste u industriji papira za poboljšanje vlažnosti papira [Wågberg 2000]. Kombinacijom različitih polielektrolita moguće je pripremiti šuplje kapsule za kontrolirano otpuštanje lijekova [Wågberg i sur., 2008]. Također je i predložena tehnika proizvodnje nanopapira s antimikrobnim svojstvima pri čemu polielektroliti služe kao vezivno sredstvo između nanočestica srebra i nanoceluloze [Martins i sur., 2012].

Zaključno, adsorpcija je lako izvediv postupak za povećanje hidrofobnog karaktera nanoceluloznih vlakana, ali se negativna strana očituje u tome što može doći do desorpcije prethodno nekovalentno vezanih molekula, zbog čega su noviji procesi usmjereni prema kemijskim modifikacijama.

### *3.3.2. Post-modifikacije nanoceluloze kemijskim reakcijama*

Ireverzibilna modifikacija nanoceluloze provodi se vezanjem pojedinačnih i polimernih molekula kemijskim vezama. Reakcije su provode na hidroksilnim skupinama nanoceluloze ili na skupinama dobivenim prethodnom modifikacijom nanoceluloze. Reakcije na hidroksilnim skupinama obuhvaćaju: esterifikaciju, acetilaciju, siliranje i karbamilaciju, a provode su u organskom mediju. Povećanje hidrofobnosti celuloznih nanovlakana uspješno se postiže uvođenjem esterske veze odnosno uvođenjem acetilne funkcionalne skupine na površinu vlakana [Hatton i sur., 2015], a reagensi koji služe u tu svrhu najčešće su karboksilne skupine, anhidridi kiselina te acil-kloridi. Dobivenim modifikacijama ostvaruju se bolja optička i mehanička svojstva te povećanu hidrofobnost. Pokazano je i da povećanim stupnjem acetilacije osiguravaju se prozirniji nanokompoziti s poboljšanom toplinskom stabilnošću i manjom higroskopnošću [Wågberg i sur., 2008].

Siliranje se sastoji od uvođenja supstituiranih sililnih skupina na površinu nanočestica celuloze [Missoum i sur., 2013] čime dolazi do povećanja hidrofobnosti nanoceluloznih vlakana. Upotrebom dimetilklorosilana kao silirajućeg reagensa u toluenu i blagim uvjetima, dobivena nanocelulozna vlakna zadržala su morfologiju [Gousse i sur., 2004], dok u oštrijim uvjetima može doći do gubitka nanostrukture [Andresen i sur., 2006]. Silirana nanoceluloza može poslužiti u svrhu stabilizacije emulzija vode u ulju [Andresen i Stenius, 2007], a zbog dobrih adsorpcijskih svojstava omogućena je primjena kao sredstvo za uklanjanje teških metala poput nikala iz vodenih otopina [Liu i sur., 2016].

Karbamilacijom nanoceluloze dolazi reakcije izocijanatnih skupina s hidroksilnim skupinama prisutnih na površini kreirajući karbamatne veze [Yi i sur., 2020]. Karbamilacija se provodi u organskom mediju, najčešće u toluenu, čijim se korištenjem izbjegavaju strukturne promjene nanoceluloze [Missoum i sur., 2012]. Istraživanja s izocijanatom, furanom i rodamin-B-esterom provedena su i s ciljem dobivanja luminiscencije. Ovakva nanoceluloza može se koristiti u sensorima i za praćenje tijeka reakcija odnosno karakterizacije nanoceluloze tijekom njezine

modifikacije [Navarro i Bergström, 2014]. Ipak, korištenje ovakvog postupka ograničeno je zbog korištenja toluena i toksičnog izocijanata.

### *3.3.3. Post-modifikacije nanoceluloze vezanjem polimera*

Nanoceluloza se može modificirati i vezanjem polimera, a u nastavku poglavlja bit će prikazan pregled postupaka vezanih uz istraživanje modifikacije nanoceluloze korištenjem polimera. Tijekom modificiranja vezanjem polimera koriste se dvije strategije. Prva strategija koristi monomere i nanocelulozu, a reakcija polimerizacije i vezanja polimera na nanocelulozu pokreće se dodatkom katalizatora. Ovim načinom modifikacije teško je kontrolirati tijek reakcije i molekulsku masu vezanih polimera, a u krajnosti se dobiva nanoceluloza modificirana polimerima male molekulske mase. Druga strategija koristi već pripremljene polimere za modifikaciju nanoceluloze, stoga se ovom strategijom omogućava kontrola tijeka reakcije i veličine vezanih polimera, ali je za razliku od prve strategije tijekom ovakvog postupka, u konačnici manji broj vezanih polimera na površini modificirane nanoceluloze. Dobivena modificirana nanoceluloza pokazuje izvrsna mehanička svojstva, toplinsku stabilnost, stoga je omogućeno njezino korištenje za izradu vodljivih materijala [Yi i sur., 2020]. Tako je primjerice nanoceluloza modificirana polimerizacijom anilina u prisutnosti amonijevog-peroksi-disulfata i klorovodične kiseline korištena za poboljšavanje mehaničkih i termičkih svojstava kompozitnih materijala koji su primjenjeni za dobivanje elektro-vodljivih materijala te u sensorima za mjerenje tlaka [Low i sur., 2021]. Također, korištenjem glicidil-metakrilata su na površinu nanoceluloze uvedene epoksidne skupine koje osiguravaju hidrofobni karakter, ali i mogućnost daljnje funkcionalizacije nanoceluloze [Stenstad i sur., 2008]. Celulozna nanovlakna prethodno oksidirana perjodatom mogu se post-modificirati polimerizacijom želatinom u cilju dobivanja mrežne strukture slične mekim tkivima u ljudskom organizmu, pa nanoceluloza tretirana na taj način predstavlja potencijal za primjenu u tkivnom inženjerstvu [Zheng i sur., 2016]. Osim navedenih modifikacija ugradnje polimera na površinu nanoceluloze, istraženo je mnoštvo drugih polimera koji se koriste u svrhu dobivanja novih funkcija nanoceluloze, a očekuje se da će broj istraživanja o ovoj temi u budućnosti još više rasti.

## *4. Bakterijska nanoceluloza (BNC)*

Osim tretmanom lignoceluloznih sirovina, nanoceluloza se još može proizvesti mikrobnim postupkom odnosno biosintezom pomoću bakterija, što bakterijsku nanocelulozu čini jednim od

biotehnoloških proizvoda. Bakterijska nanoceluloza (BNC) je vrsta nanoceluloze koja zbog svojih svojstava i mogućnosti primjene privlači veliku pozornost. Iako ima istu kemijsku formulu kao biljna celuloza,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  s n brojem ponavljajućih jedinica D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom, na makromolekulranoj razini se bakterijska nanoceluloza razlikuje po znatno većoj kristaliničnosti i većim stupnjem polimerizacije. Iako ima veliki kapacitet zadržavanja vode (sama po sebi sadrži oko 99% vode) istovremeno ima iznimno dobru mehaničku stabilnost [Numata i sur., 2015]. Mnoge vrste bakterija proizvode nanocelulozu, a najproduktivniji i najznačajniji mikroorganizam producent bakterijske nanoceluloze je Gram-negativna bakterija *Gluconobacter xylinus* [Siró i Plackett, 2010]. Biosinteza nanoceluloze u stanicama bakterija odvija se pomoću enzima celuloza sintaze u 4 ključna koraka, a to su aktivacija monosaharidnih jedinica, njihova polimerizacija, zatim adicija acilnih skupina te u konačnici izlučivanje nanoceluloze iz citoplazme kroz staničnu membranu u okolinu [Benziman i sur., 1980]. Za biosintezu BNC visoke kvalitete i što veći prinos potrebno je optimizirati parametre biosinteze te modificirati dobivenu bakterijsku nanocelulozu za dobivanje proizvoda s poboljšanim svojstvima, o čemu će biti riječ u nastavku rada.

#### 4.1 Svojstva i primjena BNC

Zbog svojstava BNC kao što su visoki stupanj čistoće i kristaliničnosti, velike površine, sposobnosti vezanja vode i mnogih drugih, BNC pronalazi primjenu u širokom spektru industrija. Elastičnost i fleksibilnost BNC kao svojstva pokazuju se poželjna u industriji papira, osobito za proizvodnju savitljivog i izdržljivog papira te se smatra poželjnim kandidatom kao materijal koji čini vezivno sredstvo za tiskanje novčanica. Biokompatibilnost, elastičnost i hidrofilitnost iznimno su važna svojstva jer na taj način BNC ubrzava proces zarastanja rana i opekline, a pritom pruža fizičku barijeru čime se sprječava mogućnost infekcije [Beluhan, 2020]. Zbog toga što nanoceluloza posjeduje veliku mehaničku čvrstoću, sve se češće proučava to svojstvo kao ključno za primjenu u tkivnom inženjerstvu. S obzirom na to da je otkazivanje organa jedan od najopasnijih stanja pacijenata, nužan je razvitak metoda koje bi se bavile regeneracijom oštećenih ili povratkom i funkcije organa, a upravo zbog toga se područje tkivnog inženjerstva tu pokazalo kao područje znanosti koje se brzo razvija. Postoje tri ključna segmenta u stvaranju tkiva, a to su stanice odnosno stanične linije ili STEM stanice koje mogu diferencirati; makromolekule kao što su faktori rasta, proteini ili ligandi koji olakšavaju adheziju stanica za „skelu“ i diferencijaciju stanica („skela“ je konstrukcija koja omogućuje trodimenzionalnu strukturu i prijanjanje stanica). Prednosti

nanoceluloze kao materijala za izradu skela u tkivnom inženjerstvu očituju se u mrežastoj strukturi s određenom poroznošću i strukturom koja imitira izvorno tkivo, a budući da animalne stanice ne proizvode enzim celulazu koji razgrađuje celulozu, ne dolazi do razgradnje (nano)celuloze unutar organizma [Li i sur., 2009]. Primjenu BNC u prehrambenoj industriji omogućuje činjenica da se smatra sigurnom tj. da ima GRAS status (eng. *Generally Regarded AS Safe*) i kao takva se može dodavati tijekom prerade hrane u svrhu zgušnjavanja, stabilizacije hrane, ali čak i u pakiranju hrane. Također može poslužiti kao materijal za biosenzore kojima se detektira promjena pH vrijednost pakirane hrane tijekom skladištenja te biosenzore koji služe u zaštiti okoliša, a detektiraju prisutnost onečišćivača [Tsouko i sur.,2015].

#### 4.2 Funkcionalizacija bakterijske nanoceluloze

Kao što je bio slučaj za nanocelulozna vlakna i nanokristale celuloze, površina bakterijske nanoceluloze se također može modificirati ovisno o željenoj primjeni. Površinska funkcionalizacija primjenjuje se ako se želi postići još opsežnija upotreba u području farmacije i medicine mijenjanjem fizikalno-kemijskih svojstava poput hidrofилности, poroznosti i teksture. Ugradnjom antimikrobnih reagenasa moguće je dobiti BNC s antimikrobnim svojstvima koja se koristi u izradi antimikrobnih obloga za rane, pakiranju sterilne medicinske opreme, dostave lijekova i tkivnom inženjerstvu.

Jedna od mogućnosti površinske funkcionalizacije je tretman BNC-a uz pomoć plazme [Chu i sur., 2002]. Tretmanom plazme sa kisikom ili dušikom dobiva se BNC hidrofilnijeg, a tretmanom plazme tetrafluorida može se proizvesti BNC hidrofobnijeg karaktera. Uvođenjem različitih kemijskih skupina mijenja se reaktivnost, vlažnost i polarnost nanoceluloze. Nakon tretmana plazmom, istraživala se učinkovitost tretirane BNC na prijanjanje staničnih linija te se utvrdilo poboljšano prijanjanje stanica na tretiranu BNC membranu [Pertile i sur., 2010]. Enzimskom hidrolizom BNC može se proizvesti nanokristalna celuloza (NCC). Dobivena NCC ima iznimno visoki stupanj kristaliničnosti s velikom specifičnom aktivnom površinom koja sadrži negativno nabijene skupine što je od velikog značaja za farmaceutsku primjenu budući da se na takvu površinu NCC može vezati velika količina lijekova [Akhlaghi i sur., 2013]. Kontrolirano ispuštanje lijekova u organizmu može se postići supstitucijom hidroksilnih skupina na površini BNC-a različitim funkcionalnim skupinama, pa su se tako kombinirale dilinoleinska kiselina (DLA) i aminokiselina tirozin s etilen diaminom (EDA) za modifikaciju BNC s poboljšanim, antimikrobnim djelovanjem protiv infekcija

rana uzrokovanih bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptomyces epidermis* i zbog tih se svojstava mogla primjenjivati u zavijanju rana [Żywicka i sur., 2018].

#### 4.3 Optimizacija- budući aspekti i izazovi

##### 4.3.1 Optimizacija hranjivog medija i industrijskih sojeva

Kao i u svakom bioprocesu, tako je i u proizvodnji bakterijske nanoceluloze potrebno optimirati sastav hranjive podloge kako investicijski troškovi i troškovi za hranjivi medij korišteni za izvođenje bioprocasa ne bi bili previsoki i neisplativi, a kako bi se istovremeno omogućio visoki prinos i kvaliteta samog proizvoda. Zbog visokih troškova fermentacije, niske produktivnosti i skupih sirovina, prijenos proizvodnje bakterijske nanoceluloze u veće mjerilo velik je izazov. Uobičajeni izvori ugljika koji se koriste u proizvodnji poput glukoze, fruktoze, saharoze, glicerola uz dodatak drugih faktora rasta su skupocjeni, stoga je glavna strategija u osiguravanju isplativog bioprocasa pronalazak jeftinijih izvora ugljika [Sharma i Bhardwaj, 2019]. Za prevladavanje ovog izazova, sve češće se proučavaju i koriste nusproizvodi otpadne mase različitih industrija kao što su prehrambena, pivarska, tekstilna industrija, ali i lignocelulozne sirovine [Tsouko i sur.,2015]. Također se razmatra proučavanje drugačijih sojeva *Gluconobacter xylinus* koji bi posjedovali sposobnost bržeg umnožavanja kako bi se smanjila duljina kultivacije, ili drugih vrsta bakterija koje imaju sposobnost biosinteze nanoceluloze, a na kojima bi se mogle primjenjivati metode genetičkog inženjerstva [Gama i sur., 2016] . Bakterije roda *Gluconobacter* proizvode i određenu količinu glukonske kiseline [Zahan i sur., 2014] za koju je pokazano da inhibira biosintezu BNC, stoga je i jedna o mogućnosti povećanja prinosa BNC-a pronalaženje soja bakterija kod kojega bi se sinteza glukonske kiseline svela na minimum. Općenito nedostaje spoznaja o molekularnim mehanizmima biosinteze BNC [Keshk i El-Kott, 2017] te bi se za bolje razumijevanje, a posljedično i unaprjeđivanje proizvodnje trebali pomnije istražiti [Sharma i Bhardwaj, 2019].

##### 4.3.2. Bioreaktori i prijenos u veće mjerilo

Visoka cijena bakterijske nanoceluloze pripisuje se niskoj brzini rasta bakterijske kulture *Gluconobacter xylinus*, zbog čega se nastoji optimirati uzgoj u bioreaktorima kako bi se povećala produktivnost i olakšao prijenos u veće mjerilo [Campano i sur., 2016]. Submerzni uzgoj i šaržni proces rezultiraju homogenom strukturom BNC-a i relativno niskim prinosom odnosno niskom

produktivnošću. Povećanje prinosa može se postići primjenom šaržnog procesa s pritokom supstrata odnosno dodavanjem svježije hranjive podloge ispod prethodno formirane BNC. [Sharma i Bhardwaj, 2019].

Bioreaktori su posude u kojima se odvijaju bioprocesi, a kao takvi osiguravaju kontrolu procesnih parametara: aeracije, koncentracije supstrata, rasta mikroorganizama te drugih parametara poput pH vrijednosti i temperature. U dosadašnjim istraživanjima najviše se proučavao učinak bioreaktora s miješalom tj. STR-a (*eng. Stirred tank bioreactor*) i „air-lift“ bioreaktora na učinkovitost proizvodnje BNC-a. Nedostatak navedenih vrsta bioreaktora za primjenu u proizvodnji BNC-a proizlazi iz toga što je uočeno prijanjanje odnosno zaostajanje BNC kulture na stijenkama i gornjem dijelu bioreaktora što posljedično dovodi do smanjenja prinosa [Krystynowicz i sur., 2002]. „Air-lift“ bioreaktor u odnosu na STR ima smanjenu sposobnost miješanja budući da u svojoj konstrukciji ne posjeduje miješalo pa je snižena brzina prijenosa kisika, dok je njegova prednost što su smična naprezanja, koja mogu narušiti strukturu BNC, puno manjeg intenziteta u odnosu na STR [Chen i sur., 2018]. Istraživana je i mogućnost korištenja rotirajućeg bioreaktora s diskovima (*eng. Rotary biofilm contractor, RBC*) koji sadrži kružno postavljene diskove čijom se rotacijom omogućuje naizmjenični pristup zraku i hranjivom mediju bakterijama roda *Gluconobacter* [Kim i sur., 2007]. Na taj se način postiže brza difuzija hranjivih tvari i kisika neophodnog za rast bakterija koje proizvode nanocelulozu, a pritom je smanjeno smično naprezanje u usporedbi s STR-om. Za postizanje bolje produktivnosti mogu se primjenjivati integrirani bioreaktorski sustavi kao što su bioreaktori s integriranom filterskom membranom koja je povezana s osovinom miješala na kojem je postavljeno turbinsko miješalo s šest lopatica [Jung i sur., 2007].

#### 4.3.3 Optimizacija metoda i tehnika

Izabrana metoda proizvodnje ovisi o krajnjoj upotrebi bakterijske nanoceluloze odnosno o njezinim fizikalnim i mehaničkim svojstvima koja se nastoje postići.

Istražena je proizvodnja BNC-a korištenjem plastičnih kompozitnih nosača (*eng. Plastic Composite supports, PCS-a*). Nosači sadrže polipropilen i smjesu izvora makroelemenata neophodnih za stvaranje BNC-a, a koji se tijekom fermentacije kontrolirano otpuštaju u okolni medij i time omogućuju biokonverziju u BNC [Pometto III i sur., 1997]. Također se razmatra upotreba tzv. „cell-free“ tehnologije u proizvodnji BNC-a čime je omogućena pretvorba supstrata u proizvod kroz slijed enzimskih kataliziranih biokemijskih reakcija, a pri čemu se ne koriste čitave bakterijske



stanice, već njihov ekstrakt koji sadrži enzime potrebne za biosintezu BNC dobivene enzimskom hidrolizom odnosno mehaničkim ili toplinskim tretmanom [Ullah i sur., 2017]. Budući da u „cell-free“ sustavima nema stanične barijere u obliku stanične stijenke ili citoplazmatske membrane, BNC se može direktno izlučivati na površini hranjivog medija za uzgoj BNC bez potrebnog specijaliziranog transportnog mehanizma za izlučivanje iz stanice. Cell free sustavi imaju prednost u tome što se energija u obliku ATP-a usmjerava u ekspresiju gena za biosintezu BNC-a te se zaobilaze energetska ograničenja potrebna za preživljavanje stanica i transportne mehanizme [Shadiac i sur., 2013]. Još jedna prednost „cell-free“ tehnologije jest i eliminacija sinteze nusproizvoda koji bi inače inhibirali biosintezu BNC.

## 5. Zaključak

U posljednjih deset godina proveden je veliki broj istraživanja vezanih uz proizvodnju i primjenu nanoceluloze. Potvrđeno je da se nanocelulozna vlakna, koja pokazuju svojstva slična gelu, mogu proizvesti korištenjem mehaničkih postupaka homogenizacije pri visokom tlaku. Druga vrsta nanoceluloze, nanocelulozni kristali, imaju manje dimenzije i zahtijevaju kemijski tretman kao što je kiselinska hidroliza pri čemu se uklanjaju amorfni dijelovi celuloze. Nanocelulozni kristali pokazuju svojstva tekućih kristala. Bakterijska nanoceluloza (BNC) se za razliku od prethodne dvije vrste nanoceluloze proizvodi uzgojem bakterija koje pripadaju rodu *Gluconobacter*. Prilagodбом uvjeta uzgoja može se utjecati na svojstva bakterijske nanoceluloze. Izgledno je da će se u budućnosti zbog povećanja potražnje za materijalima koji u sebi sadrže nanocelulozu povećati i potražnja za nanocelulozom. Stoga je potrebno uložiti dodatne napore u istraživanja i iznalaženje novim postupaka proizvodnje, uspostavu novih pilot-postrojenja kao i uvećanje mjerila procesa proizvodnje iz pilot-postrojenja u postrojenja industrijskog mjerila.

## Popis literature

- Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, *93*, 2-25.
- Börjesson, M., & Westman, G. (2015). Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. *Cellulose-fundamental aspects and current trends*, 159-191.
- Islam, M. T., Alam, M. M., Patrucco, A., Montarsolo, A., & Zoccola, M. (2014). Preparation of nanocellulose: A review. *AATCC Journal of Research*, *1*(5), 17-23.
- Siqueira, G., Tapin-Lingua, S., Bras, J., da Silva Perez, D., & Dufresne, A. (2010). Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. *Cellulose*, *17*(6), 1147-1158.
- 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*(24), 5438-5466.
- Arora, A., Nandal, P., Singh, J., & Verma, M. L. (2020). Nanobiotechnological advancements in lignocellulosic biomass pretreatment. *Materials Science for Energy Technologies*, *3*, 308-318
- Kuhad, R. C., & Singh, A. (1993). Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, *13*(2), 151-172.
- Naderi, A., Lindström, T., & Sundström, J. (2015). Repeated homogenization, a route for decreasing the energy consumption in the manufacturing process of carboxymethylated nanofibrillated cellulose?. *Cellulose*, *22*(2), 1147-1157
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A., & Lindström, T. (2007). An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European polymer journal*, *43*(8), 3434-3441.
- Rollin, J. A., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., & Zhang, Y. H. P. (2011). Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnology and bioengineering*, *108*(1), 22-30.
- Cheng, Q., Wang, S., & Rials, T. G. (2009). Poly (vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *40*(2), 218-224.
- Gumrah Dumanli, A. (2017). Nanocellulose and its composites for biomedical applications. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(5), 512-528.

Rol, F., Belgacem, M. N., Gandini, A., & Bras, J. (2019). Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. *Progress in Polymer Science*, *88*, 241-264.

Siró, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, *17*(3), 459-494.

Keerati-U-Rai, M., & Corredig, M. (2009). Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(9), 3556-3562.

Nakagaito, A. N., & Yano, H. (2004). The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. *Applied Physics A*, *78*(4), 547-552.

Heinze, T., & Koschella, A. (2005, March). Carboxymethyl ethers of cellulose and starch—a review. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 223, No. 1, pp. 13-40). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Habibi, Y., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2009). Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits. *Food Chemistry*, *115*(2), 423-429.

Jonoobi, M., Harun, J., Mathew, A. P., Hussein, M. Z. B., & Oksman, K. (2010). Preparation of cellulose nanofibers with hydrophobic surface characteristics. *Cellulose*, *17*(2), 299-307.

Chakraborty, A., Sain, M., & Kortschot, M. (2005). Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing.

Wang, B., & Sain, M. (2007). Dispersion of soybean stock-based nanofiber in a plastic matrix. *Polymer International*, *56*(4), 538-546.

Abramov, V. O. (1998). High-Intensity Ultrasonics: Theory and Industrial Applications Gordon and Breach Science Publishers.

Wang, S., & Cheng, Q. (2009). A novel process to isolate fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication, Part 1: Process optimization. *Journal of applied polymer science*, *113*(2), 1270-1275.

Zhu, J. Y., & Pan, X. J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*, *101*(13), 4992-5002.

Cheng, K. K., Zhang, J. A., Ping, W. X., Ge, J. P., Zhou, Y. J., Ling, H. Z., & Xu, J. M. (2008). Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. *Applied biochemistry and biotechnology*, *151*(1), 43-50.

Fengel, D., & Wegener, G. (Eds.). (2011). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.

- Rol, F., Karakashov, B., Nechyporchuk, O., Terrien, M., Meyer, V., Dufresne, A., ... & Bras, J. (2017). Pilot-scale twin screw extrusion and chemical pretreatment as an energy-efficient method for the production of nanofibrillated cellulose at high solid content. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 6524-6531.
- Yang, B., & Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 2(1), 26-40.
- Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., ... & Lindström, T. (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, 8(6), 1934-1941.
- Zhou, S., & Ingram, L. O. (2000). Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5676-5682.
- Nechyporchuk, O., Pignon, F., & Belgacem, M. N. (2015). Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. *Journal of Materials Science*, 50(2), 531-541.
- Moniruzzaman, M., & Ono, T. (2013). Separation and characterization of cellulose fibers from cypress wood treated with ionic liquid prior to laccase treatment. *Bioresource technology*, 127, 132-137.
- Aulin, C., Ahola, S., Josefsson, P., Nishino, T., Hirose, Y., Osterberg, M., & Wagberg, L. (2009). Nanoscale Cellulose Films with Different Crystallinities and Mesostructures· Their Surface Properties and Interaction with Water. *Langmuir*, 25(13), 7675-7685.
- Habibi, Y. (2014). Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*, 43(5), 1519-1542.
- Iwamoto, S., Kai, W., Isogai, T., Saito, T., Isogai, A., & Iwata, T. (2010). Comparison study of TEMPO-analogous compounds on oxidation efficiency of wood cellulose for preparation of cellulose nanofibrils. *Polymer Degradation and Stability*, 95(8), 1394-1398.
- Noguchi, Y., Homma, I., & Matsubara, Y. (2017). Complete nanofibrillation of cellulose prepared by phosphorylation. *Cellulose*, 24(3), 1295-1305.

Jowkarderis, L., & van de Ven, T. G. (2014). Intrinsic viscosity of aqueous suspensions of cellulose nanofibrils. *Cellulose*, *21*(4), 2511-2517.

Zhang, K., Brendler, E., Gebauer, K., Gruner, M., & Fischer, S. (2011). Synthesis and characterization of low sulfoethylated cellulose. *Carbohydrate polymers*, *83*(2), 616-622.

Ho, T. T. T., Zimmermann, T., Hauert, R., & Caseri, W. (2011). Preparation and characterization of cationic nanofibrillated cellulose from etherification and high-shear disintegration processes. *Cellulose*, *18*(6), 1391-1406.

Siller, M., Amer, H., Bacher, M., Roggenstein, W., Rosenau, T., & Potthast, A. (2015). Effects of periodate oxidation on cellulose polymorphs. *Cellulose*, *22*(4), 2245-2261.

Kim, U. J., Kuga, S., Wada, M., Okano, T., & Kondo, T. (2000). Periodate oxidation of crystalline cellulose. *Biomacromol* 1 (3): 488–492.

Larsson, P. A., Berglund, L. A., & Wågberg, L. (2014). Highly ductile fibres and sheets by core-shell structuring of the cellulose nanofibrils. *Cellulose*, *21*(1), 323-333.

Sirviö, J., Liimatainen, H., Niinimäki, J., & Hormi, O. (2011). Dialdehyde cellulose microfibers generated from wood pulp by milling-induced periodate oxidation. *Carbohydrate polymers*, *86*(1), 260-265.

Suopajarvi, T., Liimatainen, H., Hormi, O., & Niinimäki, J. (2013). Coagulation–flocculation treatment of municipal wastewater based on anionized nanocelluloses. *Chemical Engineering Journal*, *231*, 59-67.

Sirviö, J. A., Anttila, A. K., Pirttilä, A. M., Liimatainen, H., Kilpeläinen, I., Niinimäki, J., & Hormi, O. (2014). Cationic wood cellulose films with high strength and bacterial anti-adhesive properties. *Cellulose*, *21*(5), 3573-3583.

Bilodeau, M. A., & Paradis, M. A. (2020). Energy efficient process for preparing nanocellulose fibers. *U.S. Patent No. 10,563,352*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Tabar, I. B., Zhang, X., Youngblood, J. P., & Mosier, N. S. (2017). Production of cellulose nanofibers using phenolic enhanced surface oxidation. *Carbohydrate polymers*, *174*, 120-127.

Missoum, K., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, *6*(5), 1745-1766.

Hatton, F. L., Malmström, E., & Carlmark, A. (2015). Tailor-made copolymers for the adsorption to cellulosic surfaces. *European Polymer Journal*, *65*, 325-339.

Wågberg, L. (2000). Polyelectrolyte adsorption onto cellulose fibres—A review. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, *15*(5), 586-597.

Wågberg, L., Decher, G., Norgren, M., Lindström, T., Ankerfors, M., & Axnäs, K. (2008). The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir*, *24*(3), 784-795.

Martins, N. C., Freire, C. S., Pinto, R. J., Fernandes, S. C., Neto, C. P., Silvestre, A. J., ... & Trindade, T. (2012). Electrostatic assembly of Ag nanoparticles onto nanofibrillated cellulose for antibacterial paper products. *Cellulose*, *19*(4), 1425-1436.

Gousse, F. C., Chanzy, H., Cerrada, M. L., & Fleury, E. (2004). Surface silylation of cellulose microfibrils: preparation and rheological properties. *Polymer*, *45*(5), 1569-1575.

Andresen, M., Johansson, L. S., Tanem, B. S., & Stenius, P. (2006). Properties and characterization of hydrophobized microfibrillated cellulose. *Cellulose*, *13*(6), 665-677.

Andresen, M., & Stenius, P. (2007). Water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobized microfibrillated cellulose. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *28*(6), 837-844.

Liu, L., Xie, J. P., Li, Y. J., Zhang, Q., & Yao, J. M. (2016). Three-dimensional macroporous cellulose-based bioadsorbents for efficient removal of nickel ions from aqueous solution. *Cellulose*, *23*(1), 723-736.

Yi, T., Zhao, H., Mo, Q., Pan, D., Liu, Y., Huang, L., ... & Song, H. (2020). From cellulose to cellulose nanofibrils—a comprehensive review of the preparation and modification of cellulose nanofibrils. *Materials*, *13*(22), 5062.

Missoum, K., Bras, J., & Belgacem, M. N. (2012). Organization of aliphatic chains grafted on nanofibrillated cellulose and influence on final properties. *Cellulose*, *19*(6), 1957-1973.

Navarro, J. R., & Bergström, L. (2014). Labelling of N-hydroxysuccinimide-modified rhodamine B on cellulose nanofibrils by the amidation reaction. *Rsc Advances*, *4*(105), 60757-60761.

Low, D. Y. S., Supramaniam, J., Soottitantawat, A., Charinpanitkul, T., Tanthapanichakoon, W., Tan, K. W., & Tang, S. Y. (2021). Recent developments in nanocellulose-reinforced rubber matrix composites: A review. *Polymers*, *13*(4), 550.

Stenstad, P., Andresen, M., Tanem, B. S., & Stenius, P. (2008). Chemical surface modifications of microfibrillated cellulose. *Cellulose*, *15*(1), 35-45.

Zheng, X., Zhang, Q., Liu, J., Pei, Y., & Tang, K. (2016). A unique high mechanical strength dialdehyde microfibrillated cellulose/gelatin composite hydrogel with a giant network structure. *RSC advances*, *6*(76), 71999-72007

Numata, Y., Sakata, T., Furukawa, H., & Tajima, K. (2015). Bacterial cellulose gels with high mechanical strength. *Materials Science and Engineering: C*, *47*, 57-62.

Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, R. M., White, A. R., & Cooper, K. M. (1980). Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(11), 6678-6682.

Beluhan, S. (2020). Osvježimo znanje: Bakterijska nanoceluloza–mikrobno čudo ili dar prirode. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, *69*(3-4), 200-201.

Li, J., Wan, Y., Li, L., Liang, H., & Wang, J. (2009). Preparation and characterization of 2, 3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(5), 1635-1642.

Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., ... & Koutinas, A. (2015). Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International journal of molecular sciences*, *16*(7), 14832-14849.

Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P., & Huang, N. (2002). Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, *36*(5-6), 143-206.

Pertile, R. A., Andrade, F. K., Alves Jr, C., & Gama, M. (2010). Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. *Carbohydrate Polymers*, *82*(3), 692-698.

Akhlaghi, S. P., Berry, R. C., & Tam, K. C. (2013). Surface modification of cellulose nanocrystal with chitosan oligosaccharide for drug delivery applications. *Cellulose*, *20*(4), 1747-1764.

Żywicka, A., Fijałkowski, K., Junka, A. F., Grzesiak, J., & El Fray, M. (2018). Modification of bacterial cellulose with quaternary ammonium compounds based on fatty acids and amino acids and the effect on antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, *19*(5), 1528-1538.

Sharma, C., & Bhardwaj, N. K. (2019). Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, *104*, 109963.

Gama, M., Dourado, F., & Bielecki, S. (Eds.). (2016). *Bacterial nanocellulose: from biotechnology to bio-economy*. Elsevier.

Zahan, K. A., Pa'e, N., & Muhamad, I. I. (2014). Process parameters for fermentation in a rotary disc reactor for optimum microbial cellulose production using response surface methodology. *BioResources*, *9*(2), 1858-1872.

Keshk, S. M., & El-Kott, A. F. (2017). Natural bacterial biodegradable medical polymers: Bacterial cellulose. In *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers* (pp. 295-319). Woodhead Publishing.



Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose*, *23*(1), 57-91.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *29*(4), 189-195.

Chen, G., Wu, G., Alriksson, B., Chen, L., Wang, W., Jönsson, L. J., & Hong, F. F. (2018). Scale-up of production of bacterial nanocellulose using submerged cultivation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *93*(12), 3418-3427.

Kim, Y. J., Kim, J. N., Wee, Y. J., Park, D. H., & Ryu, H. W. (2007). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. PKY5 in a rotary biofilm contactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, *137*(1), 529-537.

Jung, J. Y., Khan, T., Park, J. K., & Chang, H. N. (2007). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *24*(2), 265-271.

Pometto III, A. L., Demirci, A., & Johnson, K. E. (1997). *U.S. Patent No. 5,595,893*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Ullah, M. W., Islam, M. U., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Recent advancements in bioreactions of cellular and cell-free systems: a study of bacterial cellulose as a model. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *34*(6), 1591-1599.

Shadiac, N., Nagarajan, Y., Waters, S., & Hrmova, M. (2013). Close allies in membrane protein research: Cell-free synthesis and nanotechnology. *Molecular membrane biology*, *30*(3), 229-245.

Dias, O. A. T., Konar, S., Leão, A. L., Yang, W., Tjong, J., & Sain, M. (2020). Current state of applications of nanocellulose in flexible energy and electronic devices. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 420.

Nazrin, A., Sapuan, S. M., Zuhri, M. Y. M., Ilyas, R. A., Syafiq, R., & Sherwani, S. F. K. (2020). Nanocellulose reinforced thermoplastic starch (TPS), polylactic acid (PLA), and polybutylene succinate (PBS) for food packaging applications. *Frontiers in chemistry*, *8*, 213.

Tavakolian, M., Jafari, S. M., & van de Ven, T. G. (2020). A review on surface-functionalized cellulosic nanostructures as biocompatible antibacterial materials. *Nano-Micro Letters*, *12*(1), 1-23

## **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.

Maria Drdici  
ime i prezime studenta