



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

Bakteerinoselluloosan teollisen tuotannon haasteita ja ratkaisuja

Jon-Alarik Scherf

TUTKINTO-OHJELMA

Kandidaatintyö

Syyskuu 2021

TIIVISTELMÄ

Bakteerinanoselluloosan teollisen tuotannon haasteita ja ratkaisuja

Jon-Alarik Scherf

Oulun yliopisto, prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2021, 23 s.

Työn ohjaaja yliopistolla: TkT Elisa Koivuranta

Työn tavoite on kartoittaa bakteerinanoselluloosan (BNC) teollisen mittakaavan tuotannon edellytyksiä, haasteita ja mahdollisia ratkaisuja. Työn alussa taustoitetaan materiaalin alkuperää ja erityisiä ominaisuuksia. Puhtaus, huokoisuus, korkea kiteisyys sekä polymeroitumisaste tekevät BNC materiaaleista muun muassa mekaanisesti kestäviä, helposti muokattavia ja bioyhteensopivia. Monipuoliset ominaisuudet takaavat laajan skaalan erilaisia sovelluksia ja käyttökohteita, joista on kerätty BNC:n ominaisuuksia esiin tuova taulukko.

Optimoitu kasvatusliuos on edellytys tehokkaalle BNC-synteesille, jota on pystytty tehostamaan muutamalla melko edullisellakin lisäkomponentilla. Sopivien olosuhteiden ylläpitoon on kehitetty monenlaisia fermentoreita, joista sekoituksella varustetut jatkuvatoimiset bioreaktorit soveltunevat parhaiten suurivolyymiseen tuotantoon. Työ sisältää hahmotelman edellä mainitun kaltaisesta bioreaktorin kokoonpanosta mahdollisine prosessi-instrumentteineen sekä pohdintaa ajomallista.

Tieteellisten avoimen tutkimuksen lisäksi tunnustellaan kaupallisten toimijoiden nykyistä tilannetta sekä selvennetään, kuinka merkittävästi sivuvirtojen hyödyntäminen ja kiihtyvä geenitekniikan kehitys voivat lähitulevaisuudessa parantaa saantoa ja osaltaan mahdollistaa suuremman volyymin tuotannon. Työ on toteutettu kirjallisuuskatsauksena.

Asiasanat: bakteeriselluloosa, nanoselluloosa, bioreaktori, fermentaatio

Äänekoski, 15.9.2021

Jon Alarik Scherf
Työn tekijä

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

SISÄLLYSLUETTELO

MERKINNÄT, LYHENTEET JA TERMIT

1. Johdanto	5
2. Bakterinanoselluloosa	6
2.1 Bakterinanoselluloosan ominaisuudet	7
2.2 BNC:n synteessin ravinne- ja olosuhdevaatimukset	8
2.2.1 Hiiliyhdisteet	8
2.2.2 Typpiyhdisteet	9
2.2.3 pH	9
2.2.4 Lämpötila	9
2.2.5 Happi	9
2.3 BNC:n valmistusmenetelmät	11
2.3.1 Staattinen fermentaatio	11
2.3.2 Agitoitu fermentaatio	11
2.4 BNC:n sovelluskohteita	12
3. BNC:n teollinen tuotanto	14
3.1 BNC-tuotanto maailmalla	14
3.2 BNC:n teollisen tuotannon haasteita ja ratkaisuja	15
3.2.1 Bioreaktorin optimointi BC:n kasvatukselle	15
3.2.2 Geenitekniikka – uudet mahdollisuudet ja saannon parantaminen	17
3.2.3 Sivuvirtojen hyödyntäminen raaka-aineena	17
4. Yhteenveto	18

LÄHDELUETTELO

MERKINNÄT, LYHENTEET JA TERMIT

BC	Bakteeriselluloosa tai bakteerinanoselluloosa (BNC), molempia käytetään, tarkoittavat samaa.
bioreaktori	Laite tai säiliö, jossa ylläpidetään suotuisia olosuhteita biologiselle prosessille, kuten fermentaatiolle.
CMC	Karboksimetyyliselluloosa
DP _v	Polymeroitumisaste: Montako monomeeria keskimäärin on aineen polymeereissä. Tässä siis: montako glukoosimolekyyliä (monosakkaridi) on kovalenttisesti sitoutuneena selluloosaksi (polysakkaridi) keskimäärin.
genotyyppi	Samoilla genotyypeillä on samanlaiset geenit perimässä. Selluloosaa tuottamattomalta genotyypiltä puuttuu sen mahdollistavat, toimivat geenit.
hydrolysaatti	Yleisnimi hydrolyysissä syntyville tuotteille. Esimerkiksi lignosellujen käsittelyssä korkeassa lämpötilassa ja matalassa pH:ssa lohkeaa etenkin ligniinistä aromaattisia 5–10 hiiliatomisia yhdisteitä, jotka inhiboivat mikrobien kasvua.
ilmastus	Ilman syöttö nesteeseen pumpulla esimerkiksi siksi, että happea liukenisi nesteeseen kuplien pinnalta.
kimmomoduuli	Kiinteän materiaalin jäykkyyttä, venymän suhdetta jännitykseen, kuvaava fysikaalinen suure.
kiteisyys	Aineen kiinteän faasin (osittainen) järjestäytyminen säännölliseen kiderakenteeseen, jotta molekyylien välisten sidosten määrä maksimoituisi.
<i>Komagataeibacter</i>	BC:tä syntetisoivan, malliorganismiksi valikoituneiden lajien <i>K. xylinuksen</i> ja <i>K. hanseniin</i> suvun latinankielinen nimi. On huomattava, että <i>K. xylinuksen</i> vaihtoehtoisia ja entisiä nimiä ovat myös <i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Gluconacetobacter xylinus</i> ja <i>Bacterium xylinum</i> . <i>K. hanseniin</i> synonyymeja ovat <i>Gluconacetobacter hansenii</i> ja <i>Acetobacter hansenii</i> .
lignoselluloosa	Kasvien tuottama biomassa, joka koostuu selluloosan lisäksi ligniinistä, hemiselluloosasta.
maissirankki	Maissin jauhatuksessa syntyvä viskoosi sivutuote.
melassi	Sokerin valmistuksessa syntyvä siirappimainen sivutuote.

metabolia	Solun aineenvaihdunta: ravintoaineiden pilkonta ja muokkaus yksinkertaisemmiksi molekyyleiksi ja siitä saatavan energian hyödyntäminen monimutkaisempien molekyylien rakentamisessa.
metaboliitti	Yleisnimitys aineenvaihdunnan väli- ja lopputuotteille - suuri kirjo erilaisia orgaanisia yhdisteitä.
monosakkaridi	Yksinkertainen hiilihydraatti, jonka kemiallinen kaava on $C_6H_{12}O_6$. Esimerkiksi glukoosi tai fruktoosi.
nanokomposiitti	Komposiitti, jonka komponenteista ainakin yksi omaa nanokoon (< 100 nm) mittasuhteet.
NFC	Nanofibrilloitu selluloosa tai selluloosananofibrillit (CNF): kasviperäisestä lignoselluloosasta esimerkiksi jauhamalla valmistettu nanoselluloosa.
oblikaatti aerobi	Mikrobi, jonka kasvulle hapensaanti on välttämätöntä.
ominaispinta-ala	Aineen kolmiulotteinen pinta-ala, laskien mukaan sen sisäisen huokoisuuden.
PEG	Polyetyleeniglykoli
pellikkeli	Geelimäisiä, irrallisia, silmin havaittavia BC-kasvustoja, joista muodostuu rauhallisissa fermentointiolosuhteissa yhtenäinen kalvo astian pinnalle.
pKa	Happovakio: kertoo hapon vahvuuden, kuinka suuri osa haposta luovuttaa vetyionin liuokseen.
PU	Polyuretaani
PVA	Polyvinyylialkoholi

1 JOHDANTO

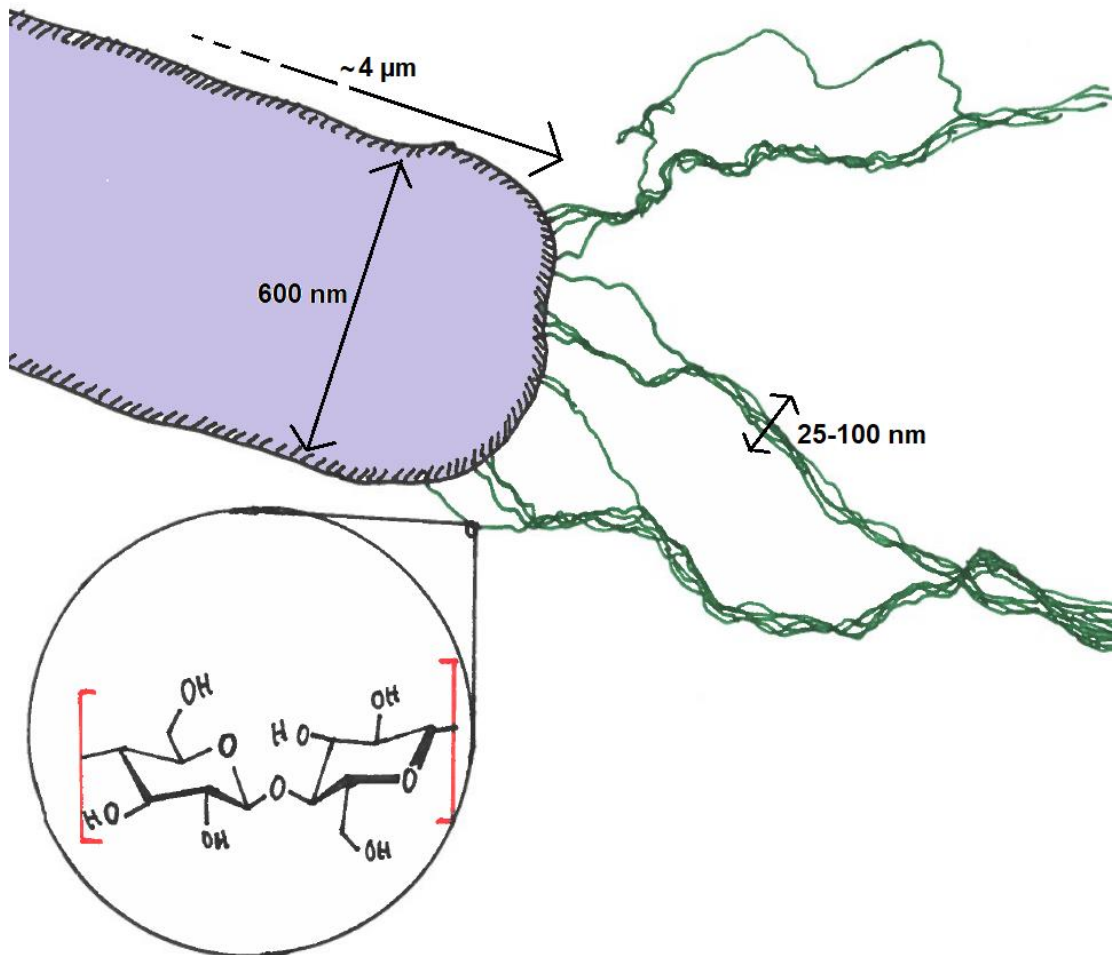
Tulevaisuuden teknologiat tulevat tarvitsemaan monenlaisia nanomateriaaleja. Verkkomaiseen, kolmiulotteiseen muotoon laskostuva bakteerin ulkopuolelleen erittämä selluloosapolymeeri on yksi niistä. On kiehtovaa, miten mikrometrien kokoiset bakteerit voivat valmistaa meille nanokoon fibrilleistä koostuvaa huokoista materiaalia, jolla vieläpä on meidän metrimaailman eliöiden mielestä aivan huikeat ominaisuudet.

Eri nanoselluloosamateriaaleille valmiita käyttökohteita löytyy jo paljon ja lisää keksitään. Tiedemaailman fokus vaikuttaa olevan vahvasti kasvipohjaisessa, lignonanoselluloosassa. Ehkäpä on luonnollista ajatella sen olevan helpompi tie, pilkkoa suuremmasta pienempää, vaikka samaan puhtauteen ja mekaaniseen kestävyYTEEN ei bakteerinanoselluloosaan verrattaessa aina päästäisikään. Kun pienet ohjelmoitavissa olevat eliöt kutovat meille materiaalia, jonka veroista ei puusta saa, niin miksi sitä sitten tuotetaan vielä niin vähän?

Bakteerinanoselluloosaa (BNC) on tutkittu vuosikymmeniä ja sitä voidaan sanoa valmistettavan jo teollisessa mittakaavassa, joskin rajoittuneesti. Tähän tartun työni loppupuolella esittelemällä BNC:n tuotannon tämänhetkisen tilanteen, ajatuksia tehokkaan sekoitusreaktorin kokoonpanosta, fermentoinnissa tunnistetut haasteet ja niihin löytyvät ratkaisut. Millaiset olosuhteet on luotava tehokkaalle synteetille ja millaisia asioita tulisi ottaa bioreaktorin kokoonpanossa huomioon? Millä ominaisuuksilla bakteeriselluloosa voi kilpailla kasvipohjaisia nanoselluloosalaatuja vastaan?

2 BAKTEERINANOSELLULOOSA

Bakteerinanoselluloosaa tuottavat useat eri sukujen bakteerit. Tuottavimmat lajit, kuten malliorganismiksi valikoituneet *Komagataeibacter xylinus* ja *Komagataeibacter hansenii*, syntetisoivat osan saamastaan sokereista selluloosarihmoina solun ulkopuolelle. Solun päässä olevista huokosista erittyvät yksittäiset glukoosimolekyylin paksuiset haarautumattomat polymeerit sitoutuvat pitkiksi, 25-100 nm paksuiksi mikrofibrilleiksi (kuva 1), joista muodostuu nanokoon nauhoja (Jonas ja Farah 1997).



Kuva 1. Bakteeriselluloosaa syntetisoiva bakteeri suuntaa-antavine mittasuhteineen: mikrofibrillien ja nanokoon nauhojen synty.

K. Xylinus obligaatina aerobina, kuten suurin osa muistakin bakteerinanoselluloosaa eli BNC:tä (myös BC) tuottavista lajeista, tarvitsee happea selviytyäkseen. Solun ulkopuolelle tuotettu, kelluttava ja geelimäinen, selluloosarihmasto tuo bakteerit pinnan läheisyyteen (Gromet ym. 1957). Pintakerrokseen nousseet geelimäiset pellikkelit muodostavat keskenään kalvomaisen rakenteen nesteen pinnalle. Selluloosapellikkelin on myös epäilty suojaavan bakteereja liialta auringon UV-säteilyltä (Williams ym. 1989) sekä mahdollisesti estävän haitallisten raskasmetalli-ionien pääsyä soluun (Iguchi ym. 2004). Paksu nanoselluloosakerros tosin hidastaa samalla hapen ja ravintoaineiden diffuusiota ja on osoitettu, että aktiivisia, selluloosaa syntetisoivia yksilöitä, elää vain noin millimetrin syvyydessä pellikkelin tai kalvon pinnalla (Hornung ym. 2006).

2.1 Bakteerinanoselluloosan ominaisuudet

Bakteerien tuottama selluloosamolekyylä on kemiallisesti identtistä kasvien tuottaman selluloosan kanssa (Hestrin ja Schramm 1954). BNC on valmiiksi hyvin puhdasta sisältäen puhdistamattomana vain soluja, pieniä määriä ravintoaineita ja joitakin metaboliatuotteita. Laadukkaiden nanoselluloosamateriaalien valmistuksen kannalta se väistää eri lignoselluloosaraaka-aineiden haasteet, sillä siinä ei ole ligniiniä tai edes hemiselluloosaa ja se on valmiiksi tasaisesti nanofibrilloitunutta. Sellunkeiton lipeää, rikkiyhdisteitä tai valkaisua ei tarvita, kuten ei myöskään nanokokoon tähtävää mekaanista tai kemiallista kuitujen hajotusta (Kangas 2014).

Puhtaampi muoto lupaa myös parempia ominaisuuksia: BNC:lla on korkeampi kiteisyys ja polymeroitumisaste sekä suurempi ominaispinta-ala lignosellupohjaisiin vastaaviin laatuihin verrattuna. Harvempien vieraiden komponenttien tarjotessa vähemmän haitallisia kilpailevia reaktioita, on puhtaampi materiaali myös paremmin kemiallisesti muokattavissa. Mekaanista kestävyyttä parantava korkea kiteisyys syntyy osin juuri materiaalin puhtaudesta, jolloin heteromolekyylit eivät pääse epäsäännöllistämään selluloosamolekyylien välisiä ja sisäisiä vetysidoksia. Esimerkiksi lignonanosellujen valmistuksessa on havaittu, että polymeerien sekaan jääneet hemiselluloosamolekyylit, kuten ksylaani, vähentävät materiaalin kiteisyyttä ja siten materiaalin kestävyttä (Arola ym. 2012).

Korkea polymeroitumisaste tarkoittaa pitkiä polymeerejä, joiden synteesi on jatkunut yhtäjaksoisena ja joita ei olla valmistuksen prosesseilla, kuten jauhamalla, katkottu. Tällöin kovalenttisia, vahvoja sidoksia, on keskimäärin enemmän, jolloin myös mekaanisessa kestävyudessa (esim. vetolujuus ja kimmomoduuli) voidaan päästä pidemmälle (Watanabe ym. 1997).

Tasainen, erittäin hieno mikrofibrillien verkkorakenne luo suuren ominaispinta-alan materiaalin kolmiulotteiseen rakenteeseen, jolloin glukoosimonomeerien hydroksyyliyhdykset ovat vapaina sitomaan vetysidoksin muita polaarisia yhdisteitä, kuten vettä. Erittäin hydrofiilisenä ja huokoisena materiaalina, BNC:n vedenpidätyskyky on monia muita nanoselluloosamateriaaleja suurempi (Ul-Islam ym. 2012).

BNC on materiaalina biohajoava sekä bioyhenteensopiva, mikä mahdollistaa sen käytön elintarviketeollisuudessa sekä lääketieteellisissä sovelluksissa. Puhtaus haitta-aineista ja minimaalisempi tarve kemiallisille käsittelyille tekevät materiaalista samalla ympäristölle ystävällisen vaihtoehdon. Tosin selluloosaa tehokkaasti tuottavat bakteerit ovat kaikki gram-negatiivisia, jolloin niiden solukalvoilta löytyy eläimille haitallisia endotoksiineja sen verran, ettei ilman tehokasta puhdistamista BNC:tä voi käyttää esimerkiksi haavasiteenä tai implanttina (Pigaleva ym.2019).

2.2 BNC:n synteessin ravinne- ja olosuhdevaatimukset

Lisääntyäkseen ja nanoselluloosaa tuottaakseen, bakteerin tulee saada kasvatusliuoksesta sopivia hiili- ja typpiyhdisteitä sekä happea, ja liuoksen pH:n ja lämpötilan tulee olla suotuisia. Kappaleen loppuun on koottu ehdotus synteettisestä kasvatusliuoksesta olosuhteineen (taulukko 1).

2.2.1 Hiiliyhdisteet

Hiiliyhdisteet toimivat solun päätoimisena rakennusmateriaalina kuten myös selluloosasynteessin raaka-aineena ja niiden sidoksista saadaan tarvittava käyttövoima solun metaboliaan. *K. xylinus* kykenee käyttämään energian ja hiilien lähteenään useita eri monosakkarideja sekä joitakin oligosakkarideja, orgaanisia happoja ja alkoholeja (Ramana ym 2000). Kuitenkin tehokkaimpina selluloosan tuoton kannalta on osoitettu olevan glukoosi, fruktoosi, maltoosi ja glyseroli (Satoshi ym. 1993 ja Chen ym. 2019a),

joista ensin mainittu, tarkemmin D-glukoosi, toimii solussa selluloosapolymeerin ”rakennuspalikkana”, monomeerinä (Hestrin ja Schramm 1954). Myös sakkaroosi pitoisella melassilla on päästy suuriin saantoihin (Keshk ja Sameshima 2006). Etanoli- (Minor ym. 1954) ja laktaattipitoisuuksien (Matsuoka ym. 1996) on havaittu jopa moninkertaistavan selluloosan tuoton glukoosi- tai fruktoosipohjaisen kasvatusliuoksen lisänä. Hiililähteen valinnalla on joitakin vaikutuksia BNC-materiaalin ominaisuuksiin, kuten fibrillien paksuuteen, polymeroitumisasteeseen ja kiteisyyteen (Chen ym. 2019a).

2.2.2 Typpiyhdisteet

Typpiyhdisteiden avulla bakteeri kykenee valmistamaan DNA- ja proteiinisynteesille välttämättömiä amino- ja nukleiinihappoja, joita tarvitaan hengissä pysymiseen, kasvamiseen ja lisääntymiseen. Biomassan ja BC:n tuoton on havaittu paranevan ylimäärällä käyttökelpoista typpeä. Sopivana typenlähteenä on käytetty mm. hiivauutetta tai maissirankkia, jotka molemmat tarjoavat samalla liuokseen hyödyllisiä vitamiineja ja kivennäisaineita, ja joista huomattavasti edullisempi maissirankki sisältää lisäksi laktaattia. Metioniini-aminohapon on osoitettu olevan tehokas komponentti kasvatusliuokseen (Matsuoka ym. 1996).

2.2.3 pH

Kasvatusliuoksen optimaalinen pH-alue määräytyy bakteerilajin ja -kannan mukaan. *K. Xylinus* kykenee syntetisoimaan selluloosaa noin pH-alueella 7,5 – 4,0 tehokkaimmillaan noin pH 6,0 – 4,5 (Masaoka ym. 1993). Bakteerisolujen metaboliassa syntyneet happamat lopputuotteet, kuten erilaiset orgaaniset hapot, laskevat liuoksen pH-arvoa. Erityisesti glukoosimetaboliassa syntyy glukonihappoa. Tällöin fermentatiivisen prosessin tehokkuus laskee sen edetessä, ellei liosta ole puskuroitu tai ellei käytetä vähemmän pH:ta laskevia sokereita, kuten arbutolia (Oikawa ym. 1995). Sopivana puskurina voidaan käyttää asetaattia, jonka pKa-arvo on osuvasti 4,74 (Kuo ym. 2016).

2.2.4 Lämpötila

Samoin kuin pH, myös lämpötila vaikuttaa suoraan bakteerin toimintakykyyn ja optimilämpötila on lajiriippuvaista. Viileässä solun molekyylien lämpöliike on vähäisempää ja monet entsyymaattiset reaktiot tapahtuvat hitaammin molekyylien löytäessä harvemmin toisensa ja törmätessä keskimääräisesti pienemmällä nopeudella. Liian suurissa lämpötiloissa herkimmät molekyylit voivat hajota, proteiinit denaturoitua ja perimä vaurioitua. *K. xylinus* on mesofiili, eli se on sopeutunut noin 20 - 45 °C:n lämpötilaan, kuitenkin ollen tehokkaimmillaan selluloosan tuotannossa noin 30 °C:ssa.

2.2.5 Happi

Runsas hapensaanti on erityisen tärkeää selluloosasynteessin kannalta. Sekoittamattomissa olosuhteissa ilman ilmastusta, happea pääsee liukenemaan nesteeseen vain pinnalta, jolloin selluloosaa tuottavat vain bakteerit pinnan läheisyydessä. Lämpötilassa 30 °C hapen liukoisuus veteen on vain 7,56 mg/L. Tosin liian kasvatusliuoksen ilmastuksen on osoitettu vähentävän saantoa (Minor ym. 1954) ja sopivaksi liuoksen happisaturaatioksi on ehdotettu 10 % (Hwang ym. 1999).

Taulukko 1. Esimerkki yksinkertaisesta synteettisestä bakteerinanoselluloosan kasvatusliuoksesta ja sen olosuhteista. Maissirankki sisältää sopivan typenlähteen, kuin myös BNC:n tuottoa lisäävää laktaattia, hyödyllisiä kivennäisaineita ja vitamiineja, kuten. pyrioksiinia (B6), niasiinia (B3) ja biotiinia (B7).

Olosuhteet	
Lämpötila	28-30 °C
Happamuus	pH 4,5
Happisaturaatio	10% (= 0,76 mg/L)

Kasvatusliuos	
Glukoosi	40 g/L
Maissirankki	80 ml/L
Etanoli	6 g/L
Asetaattipuskuri ($M_{\text{CH}_3\text{COO}^-} = 59,04 \text{ g/mol}$)	200 mM = 11,8 g/L (CH_3COO^-)
Metioniini	2.5 mg/L

2.3 BNC:n valmistusmenetelmät

Bakteerinanoselluloosan valmistustavat voidaan jakaa karkeasti sekoittamattomiin (staattisiin) ja sekoitusmenetelmiin (agitoituihin). Eri menetelmillä tai bioreaktortyypeillä ei ole vaikutusta selluloosapolymerin kemialliseen rakenteeseen (pl. polymeroitumisaste), vaikkakin olosuhteet, muut metaboliitit ja kasvatusliuoksen komponentit vaikuttavat selkeästi materiaalin fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten vetolujuuteen, fibrillien kokoon ja haaroittumiseen, huokoisuuteen sekä kiteisyyteen (Chen ym. 2019a).

2.3.1 Staattinen fermentaatio

Perinteisemmässä, staattisessa valmistustavassa selluloosaa tuottavan bakteerin annetaan kasvaa liuksessa ja nanoselluloosakalvon muodostua pinnalle fermentaation edetessä. Indonesiassa tätä valmistustapaa käytetään paikallisten jälkiruokien kuten Nata de Coco:n ja Nata de Pina:n valmistuksessa: hedelmä- tai kookosmehun pinnalle syntyy geelimäinen hyytelö *K. Xylinus* - bakteerin fermentoinnin tuotteena. Menetelmä on hidas ja tilaa vaativa, mutta toisaalta se ei vaadi erityistä vaivaa kasvatuksen aikana. Tyypillinen BC:n saanto staattisissa olosuhteissa on 27 päivän fermentaatiolle noin 5g/L. Esimerkiksi Nata de Coco:n valmistus kestää kymmenestä päivästä kuuteen viikkoon. Staattisessa fermentoinnissa hapen saanti rajoittaa tuottoa, mutta ilman virtauksella ja kosteudella voidaan tehostaa sen diffusioitumista kalvon läpi (Cielecka ym. 2020).

2.3.2 Agitoitu fermentaatio

Kun selluloosaa muodostuu staattisessa liuksessa geelin vain noin millimetrin syvyydessä, on selvää, että tehokas fermentointitilavuus on verrattain hyvin pieni. Sekoituksella parannetaan hapen liukenemistä sekä ravinteiden kulkeutumista soluille. Leikkausvoimat pienentävät syntyviä nanoselluloosapellikkeitä, jolloin kasvatusliuos homogenisoituu ja pellikkeliä pinta-ala moninkertaistuu. Samalla lämpötilan ja pH:n tasainen jakautuminen bioreaktorissa tehostuu.

Sekoitusreaktorissa (eng. stirred-tank reactor, STR) saadaan jopa 7-11 kertaistettua BNC:n saanto – kahden vuorokauden sekoitettu fermentaatio vastaa siis jopa 27 päivän staattista fermentaatiota (5g/L). Haasteena on, että sekoitus suosii selluloosaa tuottamattomien genotyyppien yleistymistä populaatiossa (Hestrin ja Schramm 1954), jolloin usein sekoituksen saanto jää noin puoleen juuri toivotusta eli 2,5 g/L (Dudman

1960). Rauhallisella, vähemmän leikkausvoimia synnyttävällä sekoituksella päästään laadultaan vähintään yhtä hyvään, jopa parempaan, BNC:n polymeroitumisasteeseen, kiteisyyteen ja siten mekaaniseen kestävyysasteeseen kuin staattisella valmistuksella (Chen ym. 2019b).

Yksinkertaisimmillaan, panos-sekoitusreaktorissa (eng. batch stirred-tank reaktor, BSTR), ravinnekomponentit ja bakteeripitoinen esiliuos syötetään steriloituun, sekoituksella varustettuun reaktiosäiliöön. Jatkuva ravintoliuoksen syöttö, ilmastus ja pH:n säätö, esimerkiksi jatkuvatoimisessa sekoitussäiliöreaktorissa (eng. continuous stirred-tank reactor, CSTR), tasaavat ja parantavat bakteerien elinympäristöä ja samalla lisätty sekä tuottavuutta että saantoa. Parempaa ilmastusta ja tasaisempaa ravinteiden saatavuutta ajatellen, on kokeiltu BNC:n tuottoa myöskin mm. aerosolibioreaktoreilla, kiekobioreaktoreilla (eng. rotary bioreactor / rotating disk bioreactor) (Lin ym. 2016) ja membraanibioreaktoreilla.

2.4 BNC:n sovelluskohteita

Bakteerinanoselluloosan erityiset ominaisuudet: puhtaus, huokoinen hieno mikrofibrillirakenne, korkea kiteisyys ja polymeroitumisaste, läpinäkyvyys sekä bioyhteensopivuus mahdollistavat laajan skaalan eri sovelluskohteita (taulukko 2).

BNC:aa soveltuu hyvin erilaisiin komposiittimateriaaleihin ja korkean kiteisyyden ja polymeroitumisasteen ansiosta sen on osoitettu toimivan komposiitin lujittavana osapuolena NFC:n veroisesti tai jopa paremmin (Lee ym. 2012). Hydrogeelit soveltuvat moniin lääketieteellisiin sovelluksiin (Chang ja Zhang 2010) ja membraaneja voidaan käyttää monenlaisiin suodatustarpeisiin (Iguchi ym. 2004).

Taulukko 2. BNC:n sovelluskohteita kirjallisuudesta.

Sovelluskohteita	Materiaalikuvaus (käsittely)	BNC:n hyötyjä	Esimerkkejä
ELEKTRONIIKKA:			
Sähköä johtavat kalvot	komposiitti (hiilinanoputket)	muokattavuus, kalvomaisuus, ohuus, mekaaninen kestävyys	taipuvat näytöt
Akustiset kalvot	ohut kalvo (lämpöpuristus)	muodonpitävyys, ohuus, vetolujuus, äänen nopeus, vaimenemattomuus	kaiuttimet ja kuulokkeet
Optoelektroniikka	komposiitti (akryyli/PCL/PU)	läpinäkyvyys, muokattavuus, mek. kestävyys	OLED-näytöt
Sensorit	ohut pinnoite kvartsikivivaaka-sensorille	huokoisuus, pinta-ala, hydroskooppisuus, ohuus	kosteus- tai kaasusensori
Magnetoitavat kalvot	joustava kalvo (magnetiitti)	muokattavuus, huokoisuus, keveys, taipuvuus, joustavuus, mek. kestävyys	tiedon tallennus
LÄÄKETIEDE:			
haavasidokset	hydrogeeli (+lääkeaine/antibiotti)	bioyhteensopivuus, vedenpidätyskyky, elastisuus, imukyky,	Biofill®
3D-kasvatusalustat	hydrogeeli (perjodaattihapetus)	bioyhteensopivuus, 3D-rakenne, huokoisuus, geelimäisyys	kudosten kasvatus muotoon
synteettiset kudokset	komposiitti (PVA, jäädytys-sulatus)	bioyhteensopivuus, mek. kestävyys,	sarveiskalvo, verisuonet
PAPERI JA KARTONKI:			
Kestävät paperilaadut	BNC pitoinen paperi	suurempi kimmomoduuli, repäisylujuus ja taitettavuus	setelipaperi, raamattupaperi
Tiiviit ja taipuisat kartongit	BNC pitoinen kartonki	parannetut barrier-ominaisuudet, kestävyys, taitettavuus, keveys, turvallinen syödä	korkealaatuinen pakkauksetkartonki
SUODATUS:			
Membraani	komposiitti (muu selluloosapolymeeri/PEG/CMC)	ohuus, huokoisuus, mekaaninen kestävyys, hyvä läpäisevyys, kasvatus toisen komponentin sekaan	ultrafiltraatio, pervaporaatio, dialyysi
ELINTARVIKKEET:			
sakeuttamisaine	lisäaineena elintarvikkeessa	lämmönkestävyys, viskositeetti, turvallisuus, ominaisuuksien säilyvyys eri pH:ssa	jäätelö, sakeat juomat, tofu, Sun Artist® CELLULON™
vähäkaloriset ruoat	lisäaineena elintarvikkeessa	rakenne, kalorittomuus	Nata de Coco, laihdutusdieetit

3 BNC:N TEOLLINEN TUOTANTO

3.1 BNC-tuotanto maailmalla

Bakteeriselluloosan markkina-arvo maailmalla vuonna 2019 oli noin 274 M€ ja vuoteen 2026 mennessä on arvioitu sen kasvavan jopa 662 M€:n arvoon. Vuotuinen kasvu on ollut 2010-luvun ajan noin 10-15 % (360 Market Updates, 2021). Suurin osa BNC:stä kasvatetaan staattisesti, vaikkakin agitoituja, sekoituksella varustettuja fermentoreita on jo teollisessa käytössä.

Staattisesti valmistetusta BNC:sta suurin osa tuotetaan Kaakkois-Aasiassa, jossa lämmin ilmasto suo edullisemmat puitteet tilaa vievien fermentaatiovuokien säilytykselle. Oman haasteensa staattiseen fermentointiin tuo suuri kontaminaatoriski, sillä se vaatii paljon steriloitua astiapinta-alaa sekä puhdasta varastotilaa, samalla kun 30°C lämpötila parantaa myös muiden mikrobien kasvua ja määrää tuotantoympäristössä. Kontaminaatoriski vaikuttaa osaltaan tuotantokapasiteettiin ja tuotteen elintarviketurvallisuuteen. (Zhong, 2020)

Agitoiduissa olosuhteissa BNC:ta valmistetaan lähinnä sakeuttamisaineeksi elintarviketeollisuuteen. Suuret tuottajat CPKelco ja japanilainen San-Ei Gen F.F.I. Inc. valmistavat agitoidulla fermentaatiolla mm. tuotemerkkejä CELLULOON™ ja Sun Artist@.

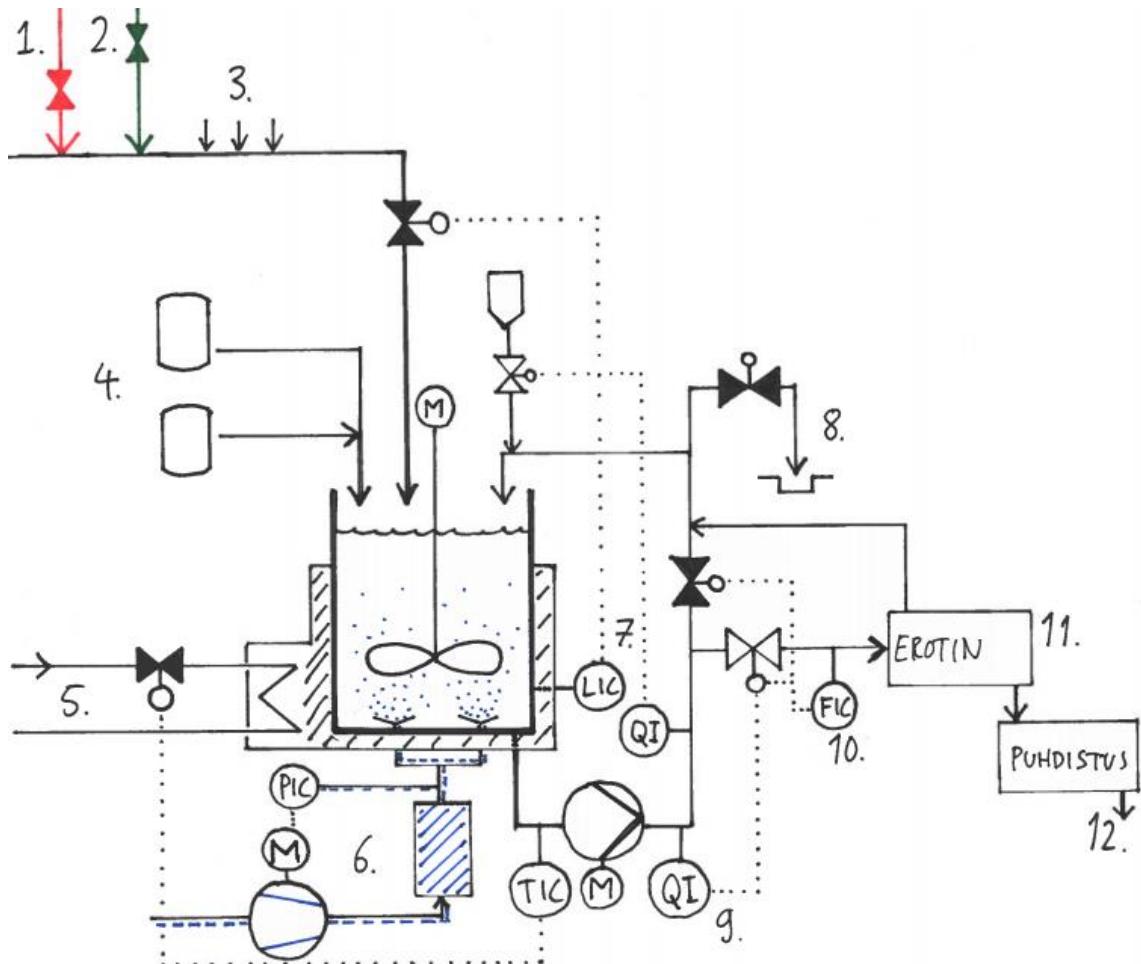
3.2 BNC:n teollisen tuotannon haasteita ja ratkaisuja

Suurimmat tuotannolliset haasteet liittyvät prosessin saantoon ja raaka-ainekustannuksiin. Saannon haasteita ovat tehokkaan fermentaatioprosessin olosuhdevaatimukset, satunnaiset kontaminaatiot ja bakteerin geneettiset ominaisuudet. Raaka-ainekustannusten madaltaminen suurivolyymisen tuotannon mahdollistamiseksi vaatii siirtymistä synteettisistä kasvatusliuoksista maatalouden ja teollisuuden sivuvirtojen hyödyntämiseen.

3.2.1 Bioreaktorin optimointi BC:n kasvautkselle

Bioreaktorin liuoksen lämpötilan, pH:n ja happisaturaation hallintaan löytyy markkinoilta valmiita mittareita ja laitteita. Kontaminaatoriskiä vähentää prosessin ajo happamalla pH-alueella, ilmastusilman filteröinti ja sopivat puhdistusvälit. Myös ravintoliuoksen ja sen annosteluun käytettävien yhteiden tulee olla steriloitavissa. Jatkuva kasvatusliuoksen syöttö vaikeuttaa bakteereja kulkemasta ja pesiytymästä vastavirtaan. Isoissa reaktoreissa kasvaa kontaminaation riski, joten sopivalla reaktorikoon porrastuksella voitaisiin välttyä kokonaisen reaktoritilavuuden rejektöimiseltä. Esimerkiksi ennen useamman kuution reaktoritilavuutta voisi olla järkevää tuottaa esireaktoreissa pienempiä, vaikkapa 50 litran annoksia. Oikean bakteeritiheyden ja laadun kannalta varmistettu annos voitaisiin syöttää pääreaktoriin, jolloin varmistettaisiin *K. Xylinuksen* määrällinen dominanssi ja kasvu reaktorissa. Vaikka reaktoriin eksyisikin muutama siellä pärjäävä muu bakteerilaji, pysyisi niiden määrä merkityksettömänä pidempään ja ajojaksot sterilointien välissä pitkinä.

Sopivina ajoparametreinä voitaisiin käyttää sakeutta ja pH-arvon muutosta. Riittävässä sakeudessa voitaisiin kierrättää liuosta erottimen kautta (Kuva 2). Pumpulla varustetussa kiertoyhteessä voisi samalla olla mittalaitteet, jotta ne huuhtoutuisivat ajossa. Lämpötilan, pH:n ja sakeuden mittauksen lisäksi yhteeseen voisi liittää happisaturaatiota mittaavan laitteen, jonka avulla määrittää ilmastuksen paine. Osa erotuksen kautta kiertävästä kasvatusliuoksesta tulisi rejektoida, jottei haitallisten metaboliittien määrä kasvaisi lopulta tuotantoa rajoittaviin pitoisuuksiin. Ehkäpä myös kierron alkupään sijainnilla tai reaktoriastian muodoilla voidaan avittaa bakteeriselluloosa pellikkeliä kulkeutumista kiertoon.



Kuva 2. Yhdenlainen hahmotelma bakteerinanoselluloosaa tuottavasta CSTR-bioreaktorista instrumentteineen. Kuvassa 2 esitettyjen numeroiden tarkempi selitys on esitetty alla.

1. Höyry-yhde reaktorin ja yhteiden pesuun sekä autoklaviointiin
2. Pesukemikaaliyhde
3. Ravintoliuoksen ja veden syöttö reaktoriin
4. Esireaktorit fermentoinnin tehokkaaseen käynnistämiseen, aina pesun jälkeen
5. Kuumavesilinja sekä lämmönmittaus ja -sääto (TIC) automaattiventtiilillä
6. Ilmastus: puhallin, suodatin, paineenmittaus ja -sääto (PIC)
7. Pinnanmittaus ja -sääto ravintoliuoksen syötöllä; pH:n mittaus ja sääto (QI)
8. Rejektin ajo ulos prosessista ja näytteenotto
9. Sakeusmittaus (QI) ja erottimelle menevän virtauksen avaus sopivassa sakeudessa
10. Reaktorin kierron sääto ja erottimelle menevän virtauksen sääto (FIC)
11. Erottimelta otetaan osa kasvatusliuoksesta takaisin reaktoriin ja osa voidaan rejektöidä.
12. Puhdistus voidaan suorittaa, halutusta puhtaudesta riippuen ylikriittisellä hiilidioksidilla (Pigaleva ym. 2019) tai vedellä ja alkalilla.

3.2.2 Geenitekniikka – uusia mahdollisuuksia ja saannon parantaminen

Geenitekniikka on yksi kulmakivi fermentointiprosessin saannon parantamisessa. Selluloosaa tuottaville bakteereille on viime vuosina luotu jo omia spesifejä geenitekniikan työkaluja (Florea ym. 2016). Selluloosasynteisiin kykenevälle bakteerille on mm. siirretty entsyymi, joka mahdollistaa uuden metaboliareitin BC-synteesiin, parantaen saannon jopa 3-kertaiseksi (Nakai ym. 1999). Myös laktaasientsyymin geeni on saatu siirrettyä *K. xylinukselle*, jolloin kanta pystyy valmistamaan BC:aa esimerkiksi juustoteollisuuden sivutuotteena syntyvästä laktoosipitoisesta herasta (Battad-Bernardo ym. 2004). Siirtämällä happea sitovan proteiinin, bakteerihemoglobiinin geenit toisesta bakteerilajista on saatu kanta, joka kykenee BC-synteesiin aikaisempaa niukemmassa happipitoisuudessa (Chien ym. 2006). Perimää muokkaamalla on voitu myös hyödyllisesti vaikuttaa materiaalin huokoisuuteen ja kestävyysominaisuuksiin (Jacek ym. 2018).

Joskus BC:tä tuottava bakteerikanta voisi myös pystyä tuottamaan itse tarvittavat entsyymit puukuidun pilkkomiseen ravinnokseen. Agitoidun fermentaation genotyyppiongelman hillitsemiseksi voitaisiin tehdä geneettinen tappokytkin, joka linkittää selluloosan tuoton ehdoksi johonkin sen vitaaliin elintoimintoon tai jakautumiseen. Ehkäpä selluloosaa tuottamattomien genotyyppien yleistymistä voitaisiin rajoittaa myös sellaisella valikoivalla valmistusprosessilla, joka fyysisesti suosisi selluloosaa tuottavien yksilöiden säilymistä kasvatusliuoksessa.

3.2.3 Sivuvirtojen hyödyntäminen raaka-aineena

Maatalouden ja teollisuuden sivuvirtojen käytön fermentaation raaka-aineina arvioidaan alentavan merkittävästi BNC:n valmistuskustannuksia ja avaavan mahdollisuuksia suurempivolyyymiin, perinteisesti kasvipohjaisten lignonoselluloosien hallitsemiin sovellutuskohteisiin. Kaikenlaisia sokeripitoisia elintarviketeollisuuden tähteitä (Hong ja Qiu 2008; Goelzer ym. 2009), puuvillatekstiilijätettä (Kuo ym. 2010), viljojen olkia (Hong ym. 2011) ja kuituteollisuuden jätelietteitä on kokeiltu BNC:n tuotannossa. Esimerkiksi sellu- ja paperiteollisuuden sivuvirtana syntyvästä kuitulietteestä saadaan entsyymaattisesti pilkottua fermentointiin sopiva, tuottavuudeltaan synteettisen glukoosin veroinen hiilenlähde (Chen ym. 2017). Lignosellupohjaisten raaka-aineiden

haittapuolena on käsittelyssä syntyvät hydrolysaatit, jotka rajoittavat bakteerien kasvua (Jönssön ja Carlos 2016). Tähän on vastattu etsimällä paremman toleranssin omaavia kantoja (Zou ym. 2017).

4 YHTEENVETO

Bakteerinanoselluloosa on materiaalina hyvin uniikki ja säilyttänee kasvavan paikkansa erityisesti elintarviketeollisuudessa, kauneudenhoidossa ja lääketieteellisissä sovelluksissa. Tuotantokustannusten madaltuessa mahdollistuisi BNC:n mm. käyttö paperi- ja kartonkitekollisuudessa, parantaen esimerkiksi arkkien mekaanista kestävyyttä ja tiiviyyttä.

Valmistuskustannusten lasku vaatii tehokkaampien, agitoituja olosuhteita ylläpitävien bioreaktorien optimoimista BC:n tuotannolle ja olemassa olevien teollisuuden sivuvirtojen hyödyntämistä. Arvokkaan ja kestävä materiaalin tuottaminen teollisuuden orgaanisista sivuvirroista tukisi samalla kiertotalouden tavoitteita.

Fermentaatioon liittyvät haasteet on tunnistettu ja niihin on löydetty ratkaisuja. Tuottavuus on viime vuosikymmeninä kasvanut uusien bakteerikantojen, kasvatusliuoksen optimoinnin ja soveltuvien bioreaktorien kehityksen ansiosta.

BC-materiaalien markkinat ovat kasvaneet tasaisesti viimeiset 10 vuotta. Useampi yritys on jo tarttunut mahdollisuuteen, jolloin arvatenkin osa tutkimus- ja kehitystyöstä tehdään tieteellisten julkaisujen ulkopuolella. Jatkuvasti edullistuva geenitekniikka mahdollistaa yhä uusien sivuvirtojen hyödyntämisen sekä myöskin osaltaan parantaa BC:n fermentoinnin saantoa. Enää vain markkinatalouden paine puuttuu, jotta uusia ratkaisuja todella toimeenpantaisiin: BC kilpailee lignonanoselluloosan kanssa monista samoista korkean volyymin sovellutuskohteista.

LÄHDELUETTELO

Arola, S., Malho, J-M., Laaksonen, P., Lille, M. ja Linder, M. 2012. The role of hemicellulose in nanofibrillated cellulose networks. *Soft Matter*, 9(4), 1319-1326.

Battad-Bernardo, E., McCrindle, S., Couperwhite, I. ja Neilan, B. 2004. Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. *FEMS microbiology letters*, 231(2), 253-260.

Chang, C. ja Zhang, L. 2010. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*. 84, 40-53.

Chien, L., Chen, H., Yang, P., ja Lee, C. 2006. Enhancement of cellulose pellicle production by constitutively expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in *Acetobacter xylinum*. *Biotechnology progress*, 22(6), 1598-1603.

Chen, G., Wu, G., Chen, L., Wang, W., Hong, F. ja Jönsson, L. 2019a. Comparison of productivity and quality of bacterial nanocellulose synthesized using culture media based on seven sugars from biomass. *Microbial biotechnology*, 12(4), 677–687

Chen, G., Wu, G., Chen, L., Wang, W., Hong, F. ja Jönsson, L. 2019b. Performance of nanocellulose-producing bacterial strains in static and agitated cultures with different starting pH. *Carbohydrate Polymers*. 215, 280-288.

Chen, G., Wu, G., Alriksson, B., Wang, W., Hong, F. ja Jönsson, L. 2017. Bioconversion of Waste Fiber Sludge to Bacterial Nanocellulose and Use for Reinforcement of CTMP Paper Sheets. *Polymers*. 9, 458.

Cielecka, I., Ryngajllo, M. ja Bielecki, S. 2020. BNC Biosynthesis with Increased Productivity in a Newly Desinged Surface Air-Flow Bioreactor. *Applied Sciences*, 10, 3850.

Dudman, W. 1960. Cellulose Production by *Acetobacter* Strains in Submerged Culture. *Journal of general microbiology*, 22(1), 25-39.

Florea, M., Hagemann, H., Santosa, G., Abbott, J., Micklem, C.N., Spencer-Milnes, X., de Arroyo Garcia, L., Paschou, D., Lazenbatt, C., Kong, D., Chughtai, H., Jensen, K., Freemont, P., Kitney, R., Reeve, B. ja Ellis, T. 2016. Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 113(24), E3431–E3440.

Goelzer, F., Faria-Tischer, P., Vitorino, J., Sierakowski, M. ja Tischer, C. 2009. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Materials Science & Engineering C*, 29(2), 546-551.

Gromet, Z., Schramm, M., ja Hestrin, S. 1957. Synthesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. *The Biochemical journal*, 67(4), 679–689.

Hestrin, S. ja 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.

Hong, F. ja Qiu, K. 2008. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate polymers*, 72(3), 545-549.

Hong, F., Zhu, Y. X., Yang, G. ja Yang, X. X. 2011. Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 86(5), 675-680.

Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M. ja Schmauder, H. P. 2006, Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1), *Engineering in Life Sciences*, 6(6). 537-545.

Hwang, J., Yang, Y., Hwang, J. ja Pyun, Y. 1999. Effects of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* in Agitated Culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88(2), 183-188.

Iguchi, M., Yamanaka, S. ja Budhiono, A. 2004. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261-270.

Jacek, P., Szustak, M., Kubiak, K., Gendaszewska-Darmach, E., Ludwicka, K. ja Bielecki, S. (2018). Scaffolds for Chondrogenic Cells Cultivation Prepared from Bacterial Cellulose with Relaxed Fibers Structure Induced Genetically. *Nanomaterials*, 8(12), 1066.

Jonas, R. ja Farah, L. 1997. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 101-106.

Jönsson, L. ja Martin, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103-112.

Kangas, H. 2014. Opas selluloosananomateriaaleihin. Espoo: VTT, 97 s. ISBN 978-951-38-8194-8

Keshk, S. ja Sameshima, K. 2006. The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72(2), 291-296.

Kuo, C., Chen, J., Liou, B. ja Lee, C. 2016. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food hydrocolloids*. 53, 98-103.

Kuo, C., Lin, P. ja Lee, C. 2010. Enzymatic saccharification of dissolution pretreated waste cellulosic fabrics for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 85(10), 1346-1352.

Lee, K., Tammelin, T., Schulfert, K., Kiiskinen, H., Samela, J. & Bismarck, A. (2012). High Performance Cellulose Nanocomposites: Comparing the Reinforcing Ability of Bacterial Cellulose and Nanofibrillated Cellulose. *ACS applied materials & interfaces*, 4(8), 4078-4086.

- Lin, S., Liu, C., Hsu, K., Hung, Y., Shih, T. ja Cheng, K. 2016. Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. *Cellulose*. 23, 367-377.
- Masaoka, S., Ohe, T. ja 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. ja Yoshinaga, F. 1996. A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60(4), 575-579.
- Minor, F., Greathouse, G., Shirk, H., Schwartz, A. ja Harris, M. 1954. Biosynthesis of C¹⁴-Specifically Labeled Cellulose by *Acetobacter xylinum*. I. From D-Glucose-1-C¹⁴ with and without Ethanol. *Journal of the American Chemical Society*, 76(6), 1658-1661.
- Nakai, T., Tonouchi, N., Konishi, T., Kojima, Y., Tsuchida, T., Yoshinaga F., Sakai, F. ja Hayashi, T. 1999. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS*, 96(1), 14-18.
- Oikawa, T., Morino, T. ja Ameyama M. 1995. Production of Cellulose from D-Arabitol by *Acetobacter xylinum KU-1*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1564-1565.
- Pigaleva, M., Bulat, M., Gromovykh, T., Gavryushina, I., Lutsenko, S., Gallyamov, M., Novikov, I., Buyanovskaya, A. ja Kiselyova, O. 2019. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 59-69.
- Ramana, K.V., Tomar, A. ja Singh, Lokendra. 2000. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 245-248.
- Ul-Islam, M., Khan, T. ja Park, J. 2012. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596-603.

Watanabe, K., Tabuchi, M., Ishikawa, A., Takemura, H., Tsuchida, T., Morinaga, Y. ja Yoshinaga F. 1997. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62(7), 1290-1292.

Williams, W. S. ja Cannon, R. E. 1989. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and environmental microbiology*, 55(10), 2448–2452.

Yano, H., Sugiyama, J., Nakagaito, A., Nogi, M., Matsuura, T., Hikita, M. ja Handa, K. 2005. Optically Transparent Composites Reinforced with Networks of Bacterial Nanofibers. *Advanced Materials*. 17(2), 153-155.

Zhong, C. 2020. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8.

Zou, X., Wu, G., Stagge, S., Chen, L., Jönsson, L. J. ja Hong, F. F. 2017. Comparison of tolerance of four bacterial nanocellulose-producing strains to lignocellulose-derived inhibitors. *Microbial cell factories*, 16(1), 229.

360 Market Updates: Absolute reports 2021. 5.9.2021, saatavissa: <https://www.360marketupdates.com/global-microbial-and-bacterial-cellulose-market-17980369>