



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MODIFIKACE POROZITY BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY IN SITU

MODIFICATION OF POROSITY OF BACTERIAL CELLULOSE IN SITU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Ondruchová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1714/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Barbora Ondruchová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Modifikace porozity bakteriální celulózy in situ

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma (možnosti optimalizace kultivačních podmínek při produkci bakteriální celulózy, techniky na ovlivnění porozity bakteriální celulózy).
2. Produkce bakteriální celulózy pomocí bakterie *Komagataeibacter xylinus* a její vyhodnocení.
3. Produkce porézní bakteriální celulózy.
4. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Barbora Ondruchová
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá modifikací porozity bakteriální celulózy *in situ* pomocí bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Teoretická část práce byla zaměřena na rešerši různých způsobů kultivace *Komagataeibacter xylinus* a produkci porézní bakteriální celulózy.

Velikost póru bakteriální celulózy závisí hlavně od způsobu kultivace *Komagataeibacter xylinus*. Bakteriální celulóza produkovaná staticky nebo dynamicky obsahuje póry velikosti od 0,02 μm do 10 μm . Experimentálně byl potvrzen rozdíl v porozitě ve vzorcích bakteriální celulózy připravené statickou a dynamickou kultivací. Byly také porovnané výtěžky jednotlivých kultivací. Porozita bakteriální celulózy byla dále *in situ* modifikovaná přidavkem částic vosku. Rastrovací elektronová mikroskopie potvrdila, že přidavkem částic vosku je možné významně podpořit porozitu bakteriální celulózy a zároveň zvýšit její produkci.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the production and modification of porosity of bacterial cellulose *in situ* using the bacterium *Komagataeibacter xylinus*. The theoretical part of the work was focused on the review of various methods of culturing *Komagataeibacter xylinus* and the production of porous samples of bacterial cellulose.

The sizes of pores in bacterial cellulose depend mainly on the applied cultivation method. Bacterial cellulose produced statically or dynamically contains pores with the dimensions of approximately 0.02 μm to 10 μm . The difference in porosity in bacterial cellulose prepared by static and dynamic cultivation was confirmed experimentally. The production yields of bacterial cellulose were compared and discussed. Next, the porosity of the bacterial cellulose was modified *in situ* by the addition of wax particles. Scanning electron microscopy confirmed, that the accumulation of wax particles in the production medium could significantly support the porosity of bacterial cellulose and, at the same time, increase its production.

KLÍČOVÁ SLOVA

Komagataeibacter xylinus, bakteriální celulóza, kultivace, porozita

KEY WORDS

Komagataeibacter xylinus, bacterial cellulose, cultivation, porosity

ONDRUCHOVÁ, Barbora. *Modifikace porozity bakteriální celulózy in situ* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-28]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/129952>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D., za odborné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále mé poděkování za lyofilizaci vzorků je pro pana Ing. Vojtěcha Eneva, Ph.D. z fakulty chemické, VUT v Brně. Dále děkuji za vytvoření SEM snímků pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu panu Ing. Michalovi Machovskému, Ph.D. z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, Centrum polymerních systémů.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. Teoretická část	7
2.1 Celulóza	7
2.1.1 Bakteriální celulóza	8
2.2 Bakterie rodu <i>Acetobacter</i>	12
2.3 Produkce bakteriální celulózy	12
2.3.1 Zdroje uhlíku	12
2.3.2 Režimy při kultivaci bakterií	13
2.3.3 Bioreaktory pro fermentaci bakteriální celulózy	15
2.3.4 Produkce porózní bakteriální celulózy pomocí sférických zábran	16
3. Experimentální část	19
3.1 Použité chemikálie, přístroje, pomůcky a mikroorganismy	19
3.2 Metody přípravy	20
3.2.1 Kultivace bakterií	20
3.2.2 Optimalizace podmínek kultivace	21
3.2.3 Čištění vyprodukované bakteriální celulózy	22
3.2.4 Příprava aditiva včelího vosku	22
3.2.5 Fermentace mikroporézní bakteriální celulózy	23
3.2.6 Čištění mikroporézní bakteriální celulózy	24
3.2.7 Rastrovací elektronový mikroskop	25
4. Výsledky měření a diskuze	26
4.1 Produkce bakteriální celulózy	26
4.1.1 Produkce bakteriální celulózy se sférickou zábranou	28
4.2 Příprava mikročástic včelího vosku	30
4.3 Mikroporézní bakteriální celulóza	32
5. Závěr	36
6. Literární zdroje	37
7. Seznam použitých zkratk	41

1. ÚVOD

Dnes existuje přes 15 tisíc materiálů, které se nacházejí ve stovkách modifikací. Polymery jsou nejvíce se rozvíjející skupinou nových materiálů. Na jejich bázi se také vytvářejí různé kompozity. Právě celulóza díky svým vlastnostem dokáže vylepšit rysy různých materiálů.

Celulóza je jedním z nejrozšířenějších biomateriálů na Zemi a jednou z jejich největších výhod je obnovitelný zdroj v přírodě. Obecně je syntetizována rostlinami a představuje hlavní složku buničiny, z níž se vyrábí papír. Také je produkována některými bakteriemi a syntéza bakteriální celulózy byla nejaktivněji studována u *Acetobacter xylinum*.

Bakteriální celulóza je čistá forma celulózy (neobsahuje hemicelulózu a lignin) a díky svým fyzikálně-chemickým a mechanickým vlastnostem se stala vysoce funkčním biopolymerem, který se čím dál více aplikuje v oblastech biolékařství, kosmetiky a potravinářství. Její fermentace je velmi drahá, a proto se využívá omezeně. Při její produkci lze použít levné zdroje uhlíku, kterými mohou být odpady produkované například v potravinářském průmyslu, čímž se její syntéza stane ekonomicky a taky environmentálně efektivnější. Na druhou stranu relativně nízký výtěžek, který se pohybuje v gramech na litr produkčního média, časová náročnost a náchylnost bakterií na okolní podmínky brání její průmyslové výrobě.

Bakteriální celulóza se dále vyznačuje velkou porozitou, která může být ovlivněná *in situ* při kultivaci bakterie produkující celulózu. Tato síť vzájemně propletených pórů se využívá v lékařství, kdy se porózní bakteriální celulóza může aplikovat jako náhražka odštěpené kosti.

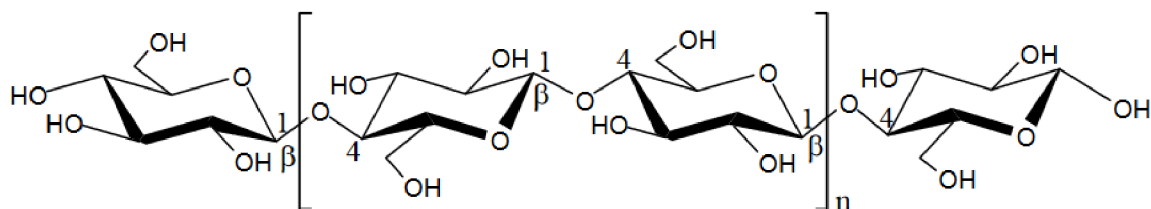
Cílem této bakalářské práce je právě syntéza mikroporézní bakteriální celulózy pomocí přidaných voskových částiček do média, a tím se předpokládá zvýšení porozity produkované celulózy oproti celulóze fermentované v médiu bez sférických zábran.

2. Teoretická část

2.1 Celulóza

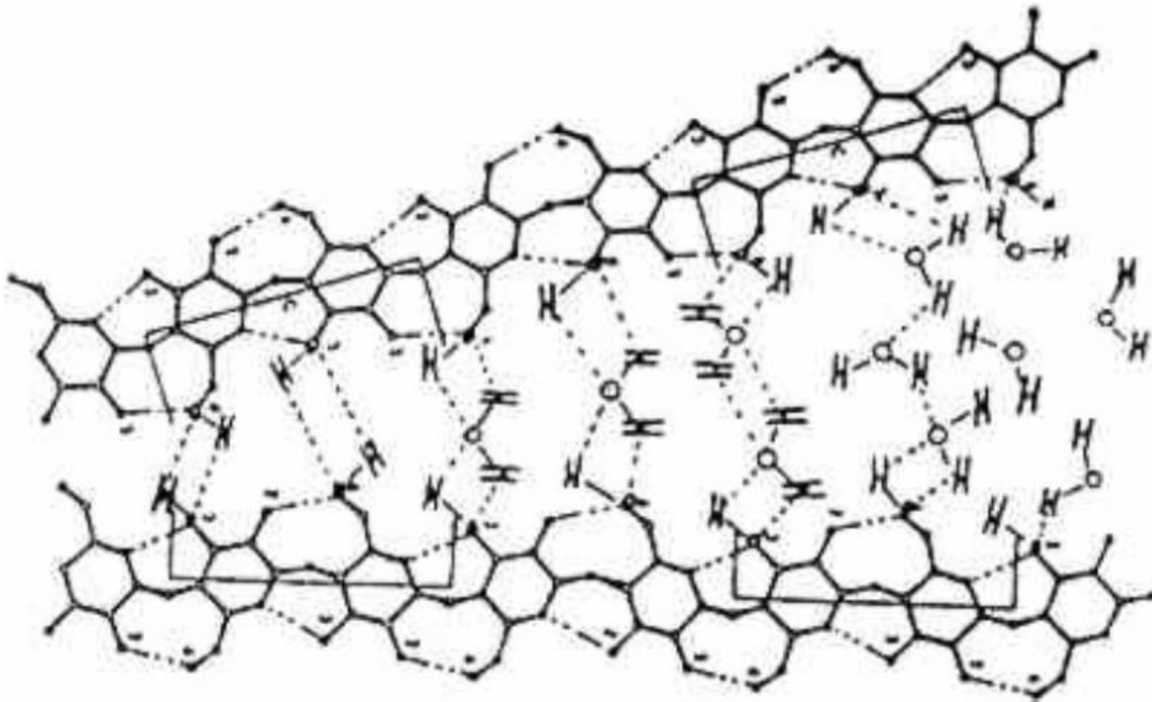
Celulóza je primárním strukturálním materiálem buněčných stěn vyšších rostlin a je základní složkou celého rostlinného života. Je to nejhojnější organický biopolymer na světě s odhadem produkce více než 1×10^{11} tun ročně. Má prakticky nevyčerpatelný zdroj obnovitelné energie. Její zdroje jsou velmi rozmanité. Celulóza se nachází v mnoha stromových a rostlinných tkání. V přírodě je často celulóza spojena s dalšími látkami, jako je lignin, pektin, hemicelulózy, tuky a bílkoviny. Taky lze celulózu najít v mnoha živých organismech. Byla dokázána u sinic, určitých hub, řas a bakteriích [1].

Molekulární struktura celulózy, která je znázorněna na *Obrázku 1*, poukazuje na to, že celulóza je homopolymer monomerních jednotek β -D-glukózy spojených pomocí β -1,4 glykosidické vazby. Tato vazba udává tyčinkovitý charakter celulózy [1].



Obrázek 1: Molekulová struktura celulózy [2]

Polymerační stupeň celulózy ovlivňují její zdroje a separace. Vodíkové můstky taky zabraňují její tavení při vysoké teplotě. Díky vodíkovým vazbám se na celulózu může navázat voda. Vazbu jejího uhlíku s vodou můžeme vidět na *Obrázku 2*. Tato vazba umožňuje další skvělou vlastnost celulózy a to udržet velké množství vody. Dále se taky celulóza vykazuje vysokým stupněm polymerace [1].



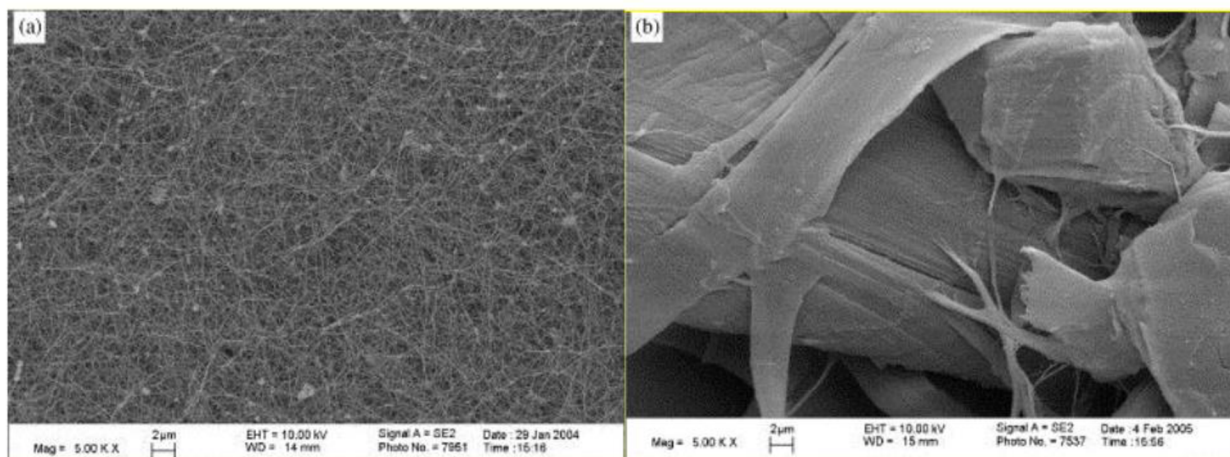
Obrázek 2: Struktura molekuly celulózy ukazující vazbu vodíku s vodou [1]

2.1.1 Bakteriální celulóza

Celulóza může být extracelulárně vylučována určitými bakteriemi patřícími k rodům *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* nebo *Sarcina*. Nejúčinnějším producentem bakteriální celulózy (BC) je *Acetobacter xylinum* [2].

Mezi BC a například dřevěnou celulózou jsou velmi důležité rozdíly, a to hlavně ve struktuře. Strukturu bakteriální a dřevěné celulózy můžeme vidět na *Obrázku 3*. BC je produkována biosyntetickými metodami na rozdíl od metod získávání celulózy chemo-mechanickými procesy. Bakteriální celulóza je vylučována jako vlákno ve tvaru pásu, které je složeno z nanofibril, jejichž plocha řezu je okolo 2-4 nm. Tyto mikrovlákná právě vytváří její velmi porézní síťovou strukturu, která se vyznačuje vysokou krystalizací. Krystalizace přidává celulóze další vnitřní vlastnosti, jako například vysoký modul pružnosti, který je vyšší než jakákoli jiná přírodní vlákna. BC je taky čistý polymer a neobsahuje látky jako hemicelulózu a lignin, které jsou právě přítomny u rostlinné celulózy. Bakteriální celulóza tedy oproti rostlinné nevyžaduje pro její čištění různé chemické ošetření [2].

Syntéza celulózy bakterií *Acetobacter xylinum* probíhá v plazmatické membráně na povrchu buněk. Při syntéze je bakterií využíván uhlík, který se získá z živného média. Syntetizovaná celulóza se polymeruje se do lineárních β -1,4-glukanových řetězců. Tyto řetězce se navzájem spojují za vzniku želatinové membrány, tedy celulózového vlákna [3, 4].



Obrázek 3: Porovnání mikro fibril celulózy: a) celulóza syntetizovaná bakterií *Acetobacter xylinum*; b) celulóza získaná ze dřeva [5]

Bakteriální celulóza díky svým vlastnostem je velmi prospěšná mnoha odvětvím. Využívá se například v lékařském, v potravinářském a papírovém průmyslu.

Bakteriální celulóza v medicíně

V medicíně díky své jedinečné struktuře a vlastnostem je mikrobiální celulóza využita pro řadu lékařských aplikací a aplikací tkáňového inženýrství. Může být použita jak pro péči o rány, tak pro regeneraci poškozených nebo nemocných orgánů. Například mikrobiální celulózová membrána byla úspěšně použita jako zařízení pro hojení ran vážně poškozené pokožky a jako náhrada cév malého průměru. Dále díky její vlastnosti zadržovat veliké množství vody je BC ideální pro vysoce kvalitní obvazy na rány [5, 6].

Určitá lékařská aplikace si určuje konkrétní struktury celulózy. Například pro umělou pokožku by celulóza měla vykazovat vysokou pórovitost a to pro lepší integraci kožních buněk. Celulóza použita jako obvaz, by měla být co nejméně porézní a měla by ránu udržovat vlhkou během procesu hojení [6].

Stále nejdůležitější požadavek biomedicínského materiálu je biokompatibilita, co znamená, že celulóza by měla zůstat v kontaktu s živou tkání bez toho, aby způsobovala jakékoli toxické nebo alergické vedlejší účinky. Existuje několik studií kompatibility *in vivo*, které používaly mikrobiální celulózu na zvířatech. Například v nedávných studiích byly kousky mikrobiální celulózy implantovány krysám. Implantáty nevykazovaly žádné známky zánětu. Místo toho byla pozorována tvorba nových krevních cév kolem a uvnitř implantované celulózy. Taky

bylo zjištěno, že fibroblasty byly schopny proniknout poréznější stranou celulózy a nově vytvořená tkáň obsahovala fibroblasty a nově syntetizovaný kolagen [6].

Jak už bylo výše zmíněno tak mikrobiální celulóza se používá jako vysoce účinný obvazový materiál vhodný pro hojení popálenin a chronických ran. Díky různým studiím bylo prokázáno, že popálenina léčená pomocí membrán celulózy se hojila daleko rychleji než popáleniny, které byly léčeny konvenční cestou, jako například pomocí vlhké gázy a různých mastí. Taky je velká výhoda mikrobiální celulózy ve tvarování a přizpůsobení různých kontur, například obličeje, co můžeme vidět na *Obrázku 4* [5,6].

V praxi BC hlavně využívají plastičtí chirurgové k léčbě jizev, otoků, ale taky ke zmírnění bolesti po operaci [5].



Obrázek 4: Bakteriální celulóza použita při léčbě obličejové popáleniny [6]

Bakteriální celulóza v kosmetice

Jak už bylo zmíněno v medicínských aplikacích mikrobiální celulózy, tak celulóza je vysoce kompatibilní materiál. Velmi dobré výsledky při léčení popálenin pomocí mikrobiální celulózy tak dalo za vznik myšlenky použít celulózu i v kosmetickém odvětví. Skvělé vlastnosti celulózy jako její vynikající přilnavost k pokožce, dále je tvořena hustou sítí vláken spojených velkým množstvím vodíkových vazeb, díky kterým je obsah vody v membráně velmi vysoký a může působit jako zvlhčující prvek, jí dávají velmi dobrý předpoklad

k aplikaci v kosmetickém odvětví. Například podle různých výzkumů zvýšilo využití mikrobiální celulózy k hydrataci pokožky až o 28 % více než tradiční mokry obklad. Taky bylo zaznamenáno snížení kožního mazu a rozjasnění pokožky [7].

Bakteriální celulóza v potravinářském průmyslu

Chemicky čistá celulóza může být použita ve zpracovaných potravinách jako zahušřovadlo a stabilizátor. Gelové vlastnosti mikrobiální celulózy a její nestálost v zažívacím traktu člověka vytvořily její potravní základnu [8].

První použití mikrobiální celulózy bylo na Filipínách, kde bylo přidáváno například do želé, a od té doby je oblíbeným občerstvením. Je používána taky díky své výrazně měkké struktuře a vysokému obsahu vlákniny. Acetobaktery byly pěstovány spolu s kvasinkami v čajovém extraktu. To se pije v Japonsku jako kombucha neboli mandžuský čaj pro zlepšení zdravotních problémů. Má svou charakterní nasládlou chuť [8].

V potravinářském světě je taky velký zájem o přídatné látky, které neobsahují tuky a tím začal velký zájem o celulózu. Například přidání 10 % bakteriální celulózy k masové kouli přidalo masu na šťavnatosti a to proto, že BC mají vynikající schopnost držet vodu. Celulóza se tak považuje za potenciální náhradu tuku v emulgovaných masných výrobcích [9].

Bakteriální celulóza v papírenském průmyslu

BC se v papírenském průmyslu začala používat pro zlepšení jeho vlastností. Bakteriální celulóza poskytuje hladší povrchy s vyšším leskem bez nijakého vlivu na fyzikální vlastnosti. Taky vyšší odolnost proti adsorpci vody. Všechny studie, které se tímto zabývaly, potvrzují zlepšení vlastností výsledného papíru, co dává potenciál vzhledu nových papírenských výrobků [10].

2.2 Bakterie rodu *Acetobacter*

Acetobacter xylinum - dalším názvem *Komagataeibacter xylinus*, je nejvíce studovaným a nejúčinnějším producentem bakteriální celulózy. Svůj metabolismus dokáže přizpůsobit různým cukrům a využít je přičemž produkuje jako extracelulární produkt bakteriální celulózu do kapalného média. Tento rod tvoří aerobní, gram-negativní bakterie, které ke své fermentaci potřebují prostředí při pH 3 až 7 a teplotě mezi 25 a 30°C a za použití sacharidů jako zdroje uhlíku [11].

2.3 Produkce bakteriální celulózy

Optimalizací produkce BC se zabývá velké množství vědců. Hledají určité růstové podmínky k maximalizování výtěžku bakteriální celulózy, aby se mohla využívat v průmyslu. Porovnávají různé metody kultivace a různé typy sacharidů, které jsou důležité jako zdroj uhlíku pro tvorbu celulózy. Kromě zdroje uhlíku je pro optimální produkci BC taky důležitý typ a objem média, pH, objem inokula, povrchová plocha kádinky, ve které dochází k inkubaci, inkubační doba a mnoho dalších aspektů [12].

2.3.1 Zdroje uhlíku

Růst pelikul s různými zdroji uhlíku studovali například Tarr a Hibbert (1931). Použili 25 vzorků, ze kterých získali nejproduktivnější cukry k produkci celulózy. Staly se jimi fruktóza, glukóza a mannitol. Z tohoto poznatku lze vyvodit, že sacharidy, které poskytují nejvyšší výtěžek syntetických polysacharidů, jsou hexózy. Disacharidy, jako laktóza, sacharóza a maltóza taky způsobují tvorbu polysacharidů, ale jejich výtěžek je daleko menší než u výše zmíněných monosacharidů. I doba syntézy je delší, protože se předpokládá další metabolický krok, kterým je katalýza disacharidu na monosacharidy. Z výsledků taky vyšlo, že i glycerol poskytuje vysoký výtěžek polysacharidu, protože *A. xylinus* oxiduje glycerol na β -uhlíku za tvorby dihydroxyacetonu. Dvě molekuly dihydroxyacetonu polymerizují za vzniku fruktózy, která se následně syntetizuje na polysacharid [13].

Při průmyslové tvorbě BC je taky velmi důležitý aspekt finanční stránka výroby. Pro snížení nákladů se dají využít odpadní produkty, které obsahují vhodný uhlíkový zdroj pro biosyntézu bakteriální celulózy. Příkladem může být například shnilé ovoce nebo vedlejší odpady potravinářského a pivovarského průmyslu, odpady z výroby bionafty, cukrovinek [14, 15].

2.3.2 Režimy při kultivaci bakterií

K optimalizaci bakteriální celulózy patří i její produkce – statická, dynamická a kontinuální. Ve všech metodách je potřeba naočkování suspenze mikroorganismů do média – inokulum, které se následně dá kultivovat většinou po dobu jednoho až tří týdnů [16].

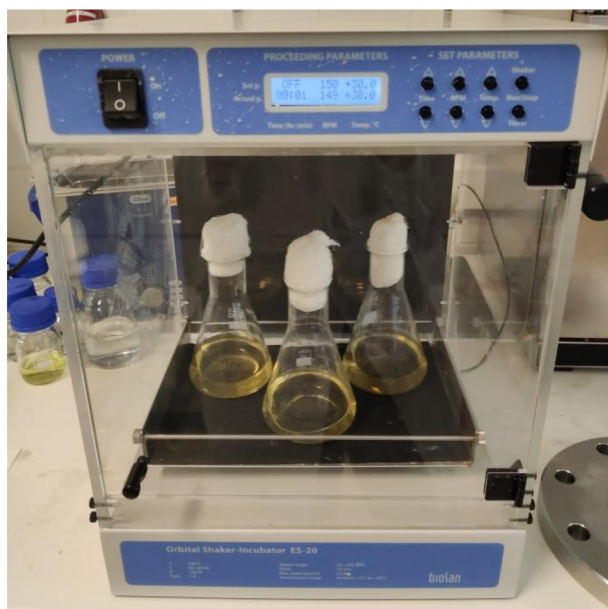
Statická kultivace

Statický režim kultivace probíhá v klidu v plochých nádobách, kdy je inokulum ponecháno ve statických podmínkách. Při statických podmínkách se vytváří BC jako želatinová membrána, která se vytváří na rozhraní vzduch - povrch kultivačního média. Tvoří se jako biofilm kolem okraje baňky a šíří se směrem ke středu. Celulóza vytvořená statickou metodou má velmi husté 3D síť s vysokou pórovitostí. Díky těmto skvělým vlastnostem výsledné celulózy se

statická kultivace v laboratorním měřítku používá nejčastěji. I když je produkce bakteriální celulózy při statické metodě celkem vysoká, její časová náročnost a vysoké náklady na fermentaci zabraňují k jejímu použití v průmyslu [16, 18].

Dynamická kultivace

Dynamický režim kultivace bakterií může být prováděn jak v Erlenmeyerových baňkách při míchání v třepačce, tak taky může být v bioreaktorech při mechanickém míchání a míchání pomocí vzduchu. Druhý způsob je výhodnější pro vyšší produkci celulózy a to díky kyslíku, který hraje klíčovou roli během její biosyntézy. Bylo zjištěno, že přívod vzduchu obohaceného kyslíkem zvýší rychlost a produkci BC v agitované kultuře až o 50%. Avšak nadměrné míchání může způsobit tvorbu nepravidelných vláken celulózy a zvýšení viskozity fermentačního média, což by dále ovlivnilo difúzi vzduchu do média. Míchací kultivace v Erlenmeyerových baňkách může probíhat v třepacím inkubátoru, ve kterém se dá nastavit teplota a různé hodnoty otáček za minutu, při kterých je inokulum mícháno po určitý počet dní. Inkubovanou třepačku, která byla používána v experimentální části této bakalářské práce, můžeme vidět na *Obrázku 5*. BC získaná dynamicky, je vláknitá nebo ve formě pelet. Tato kultivace má však negativum a to, že takto produkovaná celulóza vykazuje změny v mikrostruktuře a vlastnostech, jako je nízká mechanická pevnost celulózy, nízký index krystalinity, nízká molekulová hmotnost a nízký stupeň polymerizace. Navzdory těmto vlastnostem některé výzkumy naznačují, že agitovaná kultura v bioreaktoru může být nejvhodnější technikou pro výrobu BC v ekonomickém měřítku [16-19].

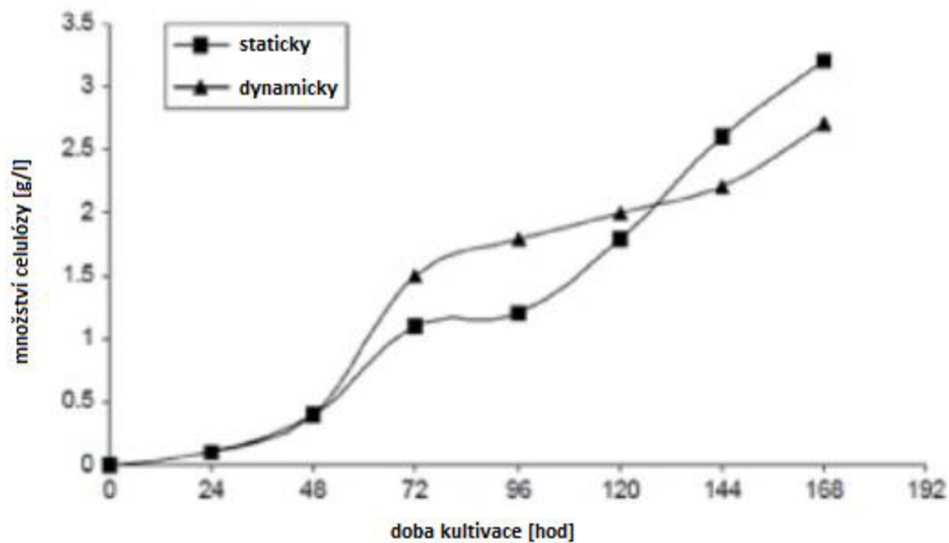


Obrázek 5: Vlastní fotografie inkubované třepačky použité k dynamické kultivaci bakteriální celulózy

Produkce BC kultivované staticky a dynamicky

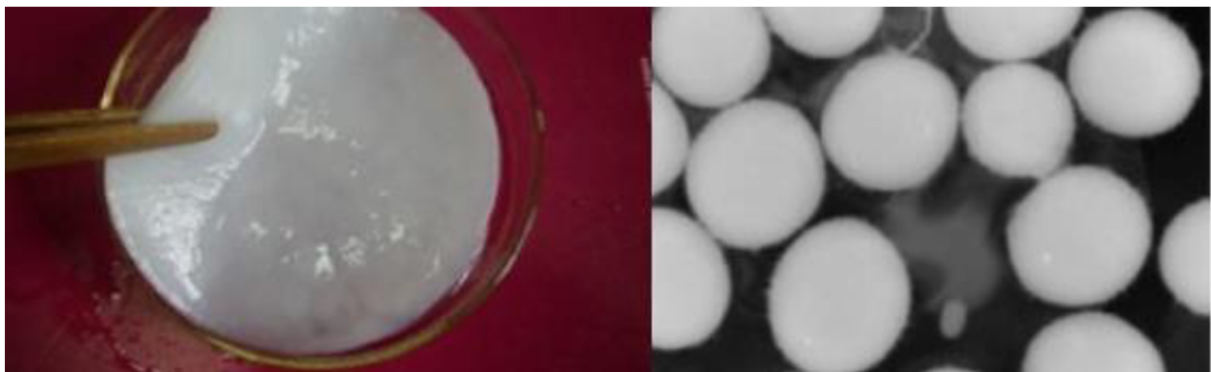
Ve své studii Wang, Tavakoli a Tang (2019) zkoumali právě statickou a dynamickou metodu kultivace a předpokládali, že při míchané kultivaci bude bakterie produkovat vyšší množství celulózy, protože obsahuje větší množství rozpuštěného kyslíku. Zjistili ale, že nadměrný přísun kyslíku vede ke snížení tvorby BC, protože v konečném výsledku při zvýšení rychlosti dodávky kyslíku do kultivačního média, bylo produkováno skoro stejné množství BC staticky i dynamicky. Dalším faktorem, který mohl přispět ke snížení produktivity, je genetická nestabilita bakterie, co znamená, že ne všechny bakteriální kmeny jsou vhodné použít dynamickou cestou za účelem zvýšení výtěžku BC. Jejich výsledek kultivace celulózy pomocí *Gluconacetobacter xylinum* při použití 50 g/l glukózy jako zdroj uhlíku za statických a za dynamických podmínek můžeme vidět na *Obrázku 6* [20].

Produkce BC také záleží na vybraném médiu, tedy roztoku chemických sloučenin, díky kterým celulóza roste. Vědci Atykyan et. al (2020) zjistili, že určité přidané látky do média mají za následek vyšší produkci BC za určitých podmínek. Například přidáním 1,5% ethanolu a melasy do roztoku média se daleko více zvýší produkce celulózy při statických podmínkách. Naopak, když se přidal roztok melasy a 0,5% kyseliny askorbové, byl zaznamenán daleko vyšší výtěžek při dynamické kultivaci. Tyhle děje může mít za následek změna konformace bakteriální celulózy během kultivace bakterií v médiu různé sloučeniny [22].



Obrázek 6: Graf v závislosti vyprodukovaného množství celulózy staticky a dynamicky za určitou dobu [20]

Strukturu vyprodukované bakteriální celulózy dynamickou a statickou kultivací můžeme následně porovnat na *Obrázku 7*.



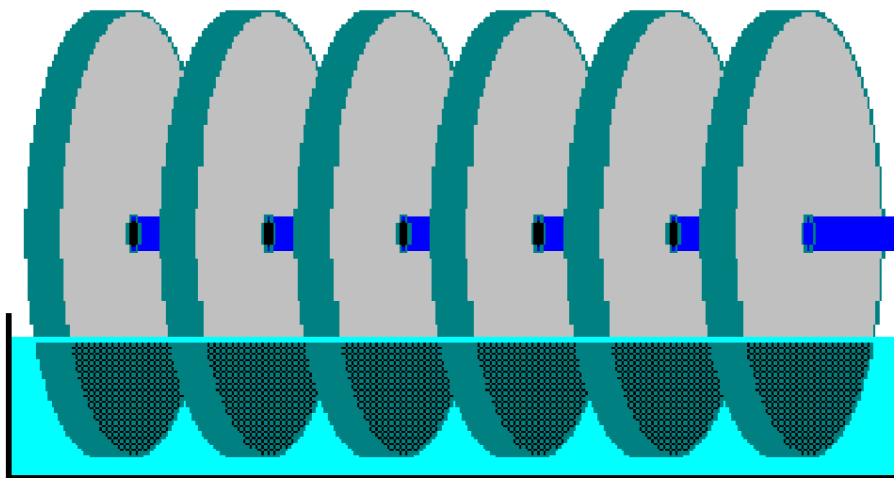
Obrázek 7: Rozdíl struktury bakteriální celulózy kultivované staticky a dynamicky [20]

2.3.3 Bioreaktory pro fermentaci bakteriální celulózy

Fermentace BC v bioreaktorech může významně zvýšit její výtěžek a zkrátit dobu produkce i s nízkými výrobními náklady. Bioreaktory pak tedy mohou zajistit její produkci v průmyslovém měřítku. Jejich jediná nevýhoda je ve struktuře získané celulózy. Je podobná jako u agitované kultury, kdy má špatné strukturní vlastnosti, a proto takto získaná celulóza nelze použít ve všech odvětvích. Například v lékařství, kdy je potřeba, aby celulóza měla

určité vlastnosti vhodné k typu jejímu použití, nelze použít syntetizovanou bakteriální celulózu z bioreaktoru [20].

Bioreaktory zajišťují přísun kyslíku a živin do kultivačního média. Ke zvýšení dodávky kyslíku může být použit bioreaktor s míchanou nádrží, ale tato metoda má velmi vysokou spotřebu energie. Dalším možným typem fermentačního reaktoru je například Airlift bioreaktor. Je to věžový reaktor, který míchá kultivační médium pomocí vytlačovaného vzduchu čerpadlem. Tento reaktor je energeticky výhodnější a jeho produkce celulózy je až o 50% vyšší než při její produkci v třepacím inkubátoru. Další reaktor možný k použití pro produkci BC je bioreaktor s rotujícím diskem. Jeho schématickou podobu můžeme vidět na *Obrázku 8*. Rotující disk se ponoří do média a na jeho drsný povrch se přichytnou bakterie. Po odběru celulózy reaktor může dále díky přichyceným bakteriím produkovat BC bez opětovného očkování a to až po dobu pěti cyklů. Tento reaktor tedy může kultivovat bakterii polokontinuálním způsobem a díky tomu se může využívat ke komerční produkci BC [20, 21].



Obrázek 8: Nákres bioreaktoru s rotujícím diskem ponořeným v kultivačním médiu [23]

2.3.4 Produkce porózní bakteriální celulózy pomocí sférických zábran

Jak už bylo uvedeno BC se může použít v mnoha odvětvích. V lékařském například jako skafoldy kostních tkání. Teda jako náhradka odštěpené kosti. Takové skafoldy, ale musí odpovídat důležitým požadavkům. Musí mít síť vzájemně propojených pórů, která by umožňovala migraci buněk a transport živin do buněk. Pro každý tkáňový typ je specifická velikost pórů, ale vždy vhodná velikost pórů by měla být větší než 300 μm a menší než 500 μm [24].

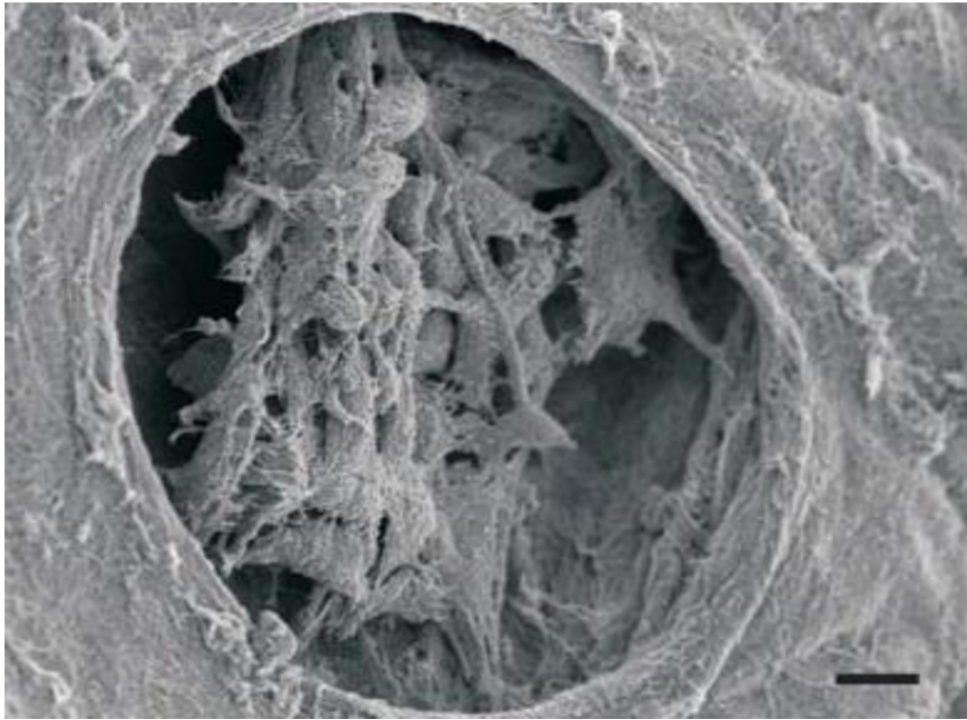
Bakteriální celulóza ale tvoří hustou síť a velikost jejich pórů je špatně přizpůsobena fyzickým rozměrům savčích buněk. Jejich velikost se pohybuje okolo 0,02 μm - 10 μm a to využití celulózy v tomhle odvětví velmi omezuje. Ke zlepšení této vlastnosti se může do materiálu zavést pórovitost začleněním aditiv modifikujících porozitu při procesu fermentace bakterie. Po fermentaci se tyto aditiva odstraní a po sobě zanechají úmyslnou síť vzájemně propojených pórů. Jako aditivum je možné tedy použít vosk, ale i například škrob [24, 25].

Vosk lze následně lehce rozpustit ve vhodné povrchově aktivní látce [26].

Pro kontrolu úplného odstranění vosku ze skafoldu celulózy může být použita Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Je to metoda, která se využívá při analýze vzorků a závisí na interakci molekul ve vzorku a jejich absorpci procházejícího infračerveného záření. Materiál zbavený parafinového vosku by měl vyzařovat záření v intervalu vlnových délek od 400 do 4000 cm^{-1} [24, 27].

Vědci Andersson et al. (2010) použili právě mikrokuličky parafinového vosku ve velikosti 150-300 μm jako aditivum pro syntézu mikroporézní BC za účelem vývoje optimálních skafoldů pro použití v tkáňovém inženýrství chrupavky. Na tyto vyprodukované skafoldy pomocí různých technik naočkovali kloubní chondrocyty a pozorovali jejich ulpívání. Po 24 hodinách kultivace buňky přilnuly k lešení a začaly vyplňovat póry, co můžeme vidět na *Obrázku 9*. Po 7 dnech však plno buněk odumřelo nebo se oddělilo od skafoldu a zůstalo jen okolo 10% živých a přilnutých chondrocytů. I tak ale začaly proliferovat a produkovat extracelulární matrix a díky tomu by mohly dále začít budovat tkáň chrupavky [28].

Experimentem potvrdili, že skafoldy na bázi porézní BC jsou skutečně vhodnými kandidáty pro aplikace regenerativní chrupavky. Materiál je ale stále potřeba lépe modifikovat, aby mohl umožnit rovnoměrnou proliferaci buněk [28].



Obrázek 9: Na obrázku lze vidět chondrocyty vyplňující pór ve skafoldu bakteriální celulózy [28]

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie, přístroje, pomůcky a mikroorganismy

Chemikálie pro přípravu médií

Pepton bakteriální – HiMedia Laboratories, Indie

Kvasniční extrakt – HiMedia Laboratories, Indie

Kyselina citrónová p.a. – Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného p.a. – Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika

D-glukosa monohydrát p.a. – Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika

Chemikálie pro přípravu mikročástic včelího vosku

Polyvinylalkohol Airvol 523 – Chemicals Incorporated, USA

Aceton – Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika

Chemikálie pro přípravu celulózy

Hydroxid sodný, p.a. – Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika

Triton X-100 – Sigma-Aldrich s.r.o., USA

Mikroorganismus

Komagataeibacter xylinus (DSM 46604, DSMZ – Německo) byl použit jako mikroorganismus produkující bakteriální celulózu v této studii.

Použité přístroje

Magnetická míchačka s ohřevem US 152 – Stuart Equipment, Anglie

Inkubovaná třepačka UNIMAX 1010 – Heidolph Instruments, Německo

Inkubovaná třepačka Orbital Shaker-Incubator ES-20 – Biosan, Litva

Sterilní laminární box AURA MINI – BioAir, Itálie

pH metr InoLab pH 720 – WTW, Česká Republika

Analytické váhy Pioneer PX Semi-Micro – OHAUS Corporation, USA

Lyofilizátor Freezone Freeze Dry Systém – Labconco Corporation, USA

Rastrovací elektronový mikroskop Nova NanoSem 450 (FEI)

Použité pomůcky

Běžné laboratorní sklo

Automatická mikropipeta – Fisher Scientific s.r.o., USA

Injekční stříkačka

Tlakový hrnec

pH indikátorové papírky

3.2 Metody přípravy

3.2.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly uchovávány v kryozkumavkách s 30% sterilním glycerolem v chladicím boxu při -80°C . Jejich kultivace probíhala nejdříve ve startovacím (použito jako sedmi denní inokulum) a následně v produkčním médiu.

Pro přípravu inokula byly jeho komponenty (*Tabulka 1*) rozpuštěny v destilované vodě a 50 ml tohoto roztoku živného média bylo sterilováno v Erlenmeyerové baňce o objemu 100 ml se zátkou a hliníkovou fólií při 100°C po dobu 30 minut. Po sterilizaci bylo médium ochlazeno na pokojovou teplotu. Pomocí 1,5 ml zásobního roztoku bakterie z kryozkumavky bylo naočkováno 50 ml živného média ve sterilním laminárním boxu. Kultivace takhle připraveného inokula probíhala na temperované při teplotě 30°C a při 150 rpm po dobu jednoho týdne.

Po uplynutí potřebné doby pro růst bakterie v živném médiu byla bakterie přeočkována z inokula do produkčního média pojmenované Hestrin a Schramm (HS). HS médium bylo připraveno podle *Tabulky 2*, při čemž všechny komponenty byly znovu rozpuštěny v destilované vodě. Sterilizace probíhala stejně jako u inokulačního média a to tak, že 100 ml připraveného roztoku bylo sterilováno v Erlenmeyerové baňce o objemu 250 ml se zátkou a hlinkovou fólií. Sterilizace probíhala v tlakovém hrnci při 100°C po dobu 30 minut. Médium bylo následně ochlazeno na pokojovou teplotu. Z inokula bylo ve sterilním laminárním boxu

odpipetováno 10 ml a jím přeočkováno 100 ml sterilovaného produkčního média. Takto bylo připraveno šest Erlenmeyerových baněk, při čemž tři z nich byly ponechány statické kultivaci a další tři dynamické kultivaci. Optimální podmínky těchto kultivací jsou popsány níže.

Tab. 1: Složení pro tvorbu inokulačního média

Chemická látka	Hmotnost [g]
Kvasniční extrakt	1
Glukosa	10
Destilovaná voda	100

Tab. 2: Složení produkčního HS média [29]

Chemická látka	Hmotnost [g]
Glukóza	2
Pepton	0,5
Kvasničný extrakt	0,5
Kyselina citrónová	0,115
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,68
Destilovaná voda	100

3.2.2 Optimalizace podmínek kultivace

Podmínky pro optimalizaci růstu bakteriální celulózy v produkčním médiu byly vytvořeny použitím monohydrátu D-glukózy jako zdroje uhlíku a pH média se rovnalo hodnotě 5. pH bylo upravováno přidávkem 1 M kyseliny chlorovodíkové nebo 1 M hydroxidem sodným a bylo určeno pomocí digitálního pH metru.

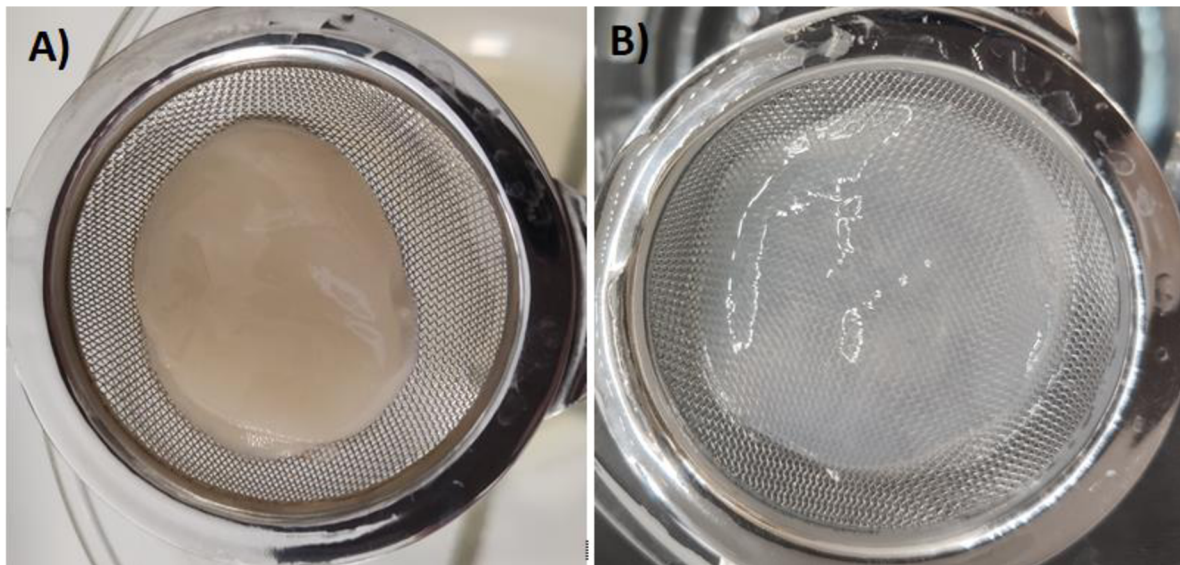
Statická kultivace probíhala 14 dnů při teplotě 30°C v klidových podmínkách.

Dynamická kultivace probíhala 14 dnů při teplotě 30°C na inkubované třepačce za stálého třepání 150 rpm.

3.2.3 Čištění vyprodukované bakteriální celulózy

Membrány BC byly po kultivaci několikrát opláchnuty destilovanou vodou a následně namočeny do vroucího 0,1 M roztoku NaOH dokud se celulóza neodbarvila z hnědé na bílou (*Obrázek 10*), čímž se odstranily bakteriální buňky, které se do mikrovláken BC zachytily. Poté byly membrány znovu několikrát promyty destilovanou vodou, aby se dosáhlo neutrálního pH, které se zkontrolovalo pomocí pH indikátorových papírků. Přechištěná celulóza byla uchovávána v chladicím boxu a následně sušena pomocí lyofilizátoru.

Lyofilizace je proces dehydratace, kdy nejdříve dojde ke zmrazení materiálu a následně se sníží okolní tlak, což má za následek sublimaci vody z pevné fáze na plynnou [30].



Obrázek 10: BC po dynamické kultivaci A) před čištěním; B) po čištění pomocí NaOH

3.2.4 Příprava aditiva včelího vosku

Rozpuštěním částic polyvinylalkoholu (PVA) ve vroucí destilované vodě byl připraven jeho 0,5 hm % roztok, který byl následně ochlazen na okolní teplotu a míchán míchadlem na magnetické míchačce.

Dále byl připraven 1% roztok rozpuštěného včelího vosku v acetonu. Roztok byl následně nastříkán pomocí injekční stříkačky do roztoku PVA, čímž se vosk srazil a vytvořil viditelné mikročástice. Roztok byl míchán míchadlem přes noc (tedy alespoň 16 hodin), aby došlo k vypaření acetonu.

Roztok s částicemi vosku byl v centrifugačních zkumavkách uchován v chladicím boxu a následně lyofilizován. Vysušené mikročástice vosku byly skladovány při pokojové teplotě.

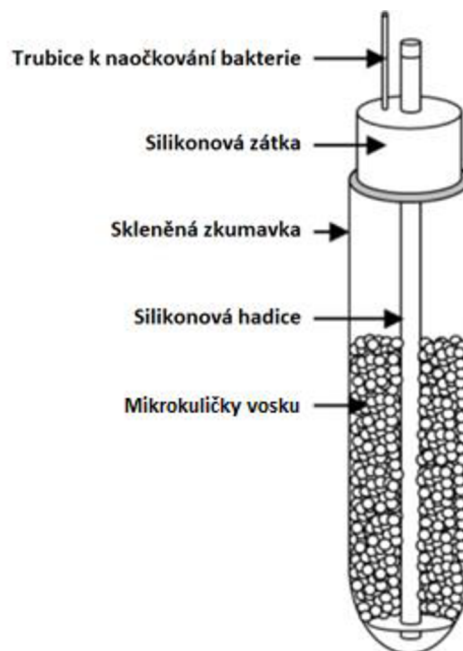
3.2.5 Fermentace mikroporézní bakteriální celulózy

Pro fermentaci porézní BC za přítomnosti částic vosku byly vyzkoušeny dva způsoby bakteriální kultivace. Jeden staticky, ale s ovlivnění aerace (vzduch byl dodáván přes hadičku do zkumavky s kultivačním médiem a bakterií) a druhý byl kultivován dynamicky na třepačce.

Fermentace porézní bakteriální celulózy se vzduchem

U prvního způsobu fermentace porézní BC byly použity skleněné zkumavky, které byly z 50 % naplněny mikročásticemi včelího vosku. Do každé zkumavky bylo přidáno 0,5 ml inokula na 2 ml kultivačního média (*Tabulka 2*), které bylo vytlačeno dolů do mikročástic vosku. Schéma lze vidět na *Obrázku 11*. Zkumavky byly vloženy do inkubátoru a připojeny ke vzduchu, aby byla zabezpečena aerace. Bakterie byly ponechány růstu po dobu 14 dnů při teplotě 30°C. Během fermentace bakterie extracelulárně produkovaly celulózu okolo mikrosfér včelího vosku.

Zkumavky, trubičky, hadičky a zátky byly předem všechny sterilovány v hliníkovém alobalu v tlakovém hrnci při 100°C po dobu 30 minut. Voskové částice byly sterilovány pod UV zářením v laminárním boxu.

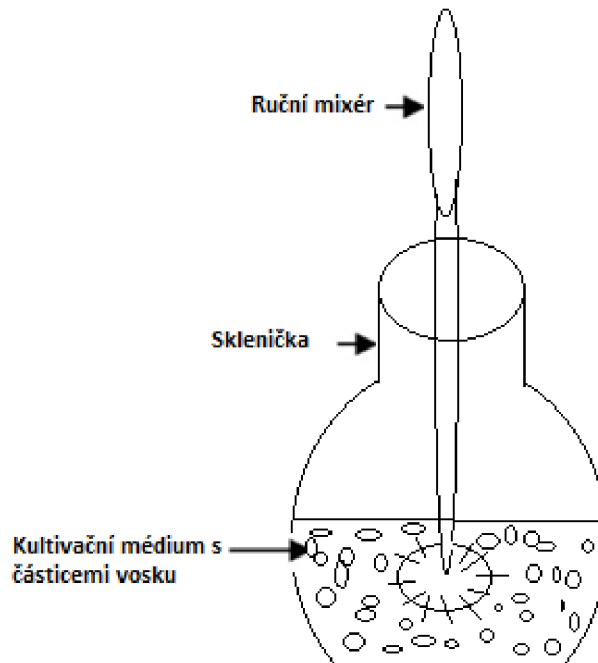


Obrázek 11: Schéma aparatury pro výrobu porézní bakteriální celulózy [24]

Fermentace porézní bakteriální celulózy dynamickou kultivací

Skleněné lahvičky byly naplněny 20 ml kultivačního média (*Tabulka 2*) a sterilovány v hliníkovém alobalu při 100°C po dobu 30 minut. Po ochlazení na okolní teplotu byly v laminárním boxu do média vloženy asepticky sterilní částice vosku. Pomocí ručního elektrického mixéru, který byl nejprve postříkán ethanolem a vysušen v laminárním boxu pod

UV světlem po dobu 30 min, byl vosk v médiu rozmělněn (schéma můžeme vidět na *Obrázku 12*). Následně bylo médium naočkováno pomocí 4 ml inokula. Kultivace bakterie probíhala dynamicky na inkubované třepačce při 150 rpm a teplotě 30°C po dobu 14 dnů, přičemž bakterie produkovala celulózu, která rostla okolo mikročástic vosku.



Obrázek 12: Vlastní schéma přípravy voskových částic v médiu před naočkováním bakterií pro produkci porózní bakteriální celulózy

3.2.6 Čištění mikroporézní bakteriální celulózy

Vyprodukovaná vlákna celulózy po fermentaci obsahovaly zbytky přichycené bakterie a taky částičky vosku. Pro odstranění bakterie byl použit stejný postup jako u přípravy neporézní BC, kdy membrány celulózy byly louhovány ve vroucím roztoku 0,1 M hydroxidu sodného do odbarvení a následně byly oplachovány do neutrálního pH destilovanou vodou.

K vyčištění vláken od voskových částic byla použita neionogenní povrchově aktivní látka Triton X-100. V této látce byla celulóza vyčištěná od bakterie šetrně míchána, aby se její vlákna neprotrhly, na magnetické míchačce, dokud nedošlo k úplnému odstranění vosku. Následně byla čistá celulóza opláchnuta destilovanou vodou, uchována v chladicím boxu a vysušena pomocí lyofilizátoru.

3.2.7 Rastrovací elektronový mikroskop

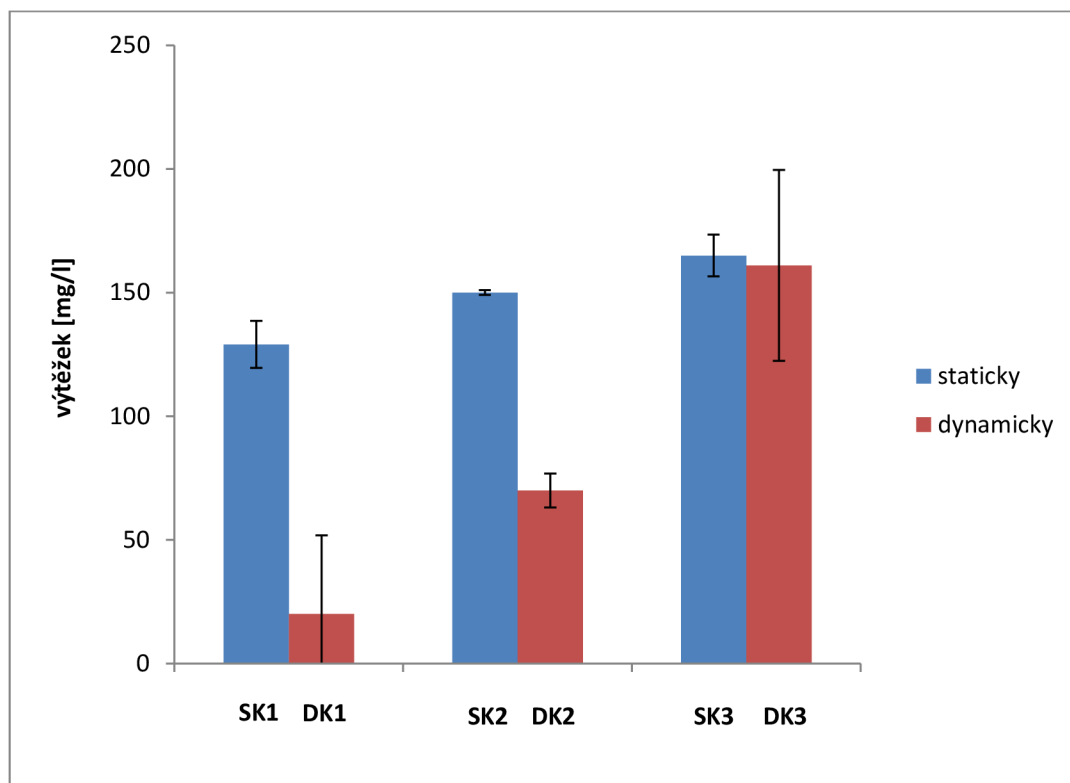
Morfologie vyprodukovaných bakteriálních celulóz byla stanovena rastrovacím elektronovým mikroskopem (REM) při použití vzdálenosti 6 až 7 mm, pod vakuem a při 5 kV.

4. Výsledky měření a diskuze

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo vyprodukovat celulózu s různou porozitou pomocí bakteriálního kmene *Komagataeibacter xylinus*.

4.1 Produkce bakteriální celulózy

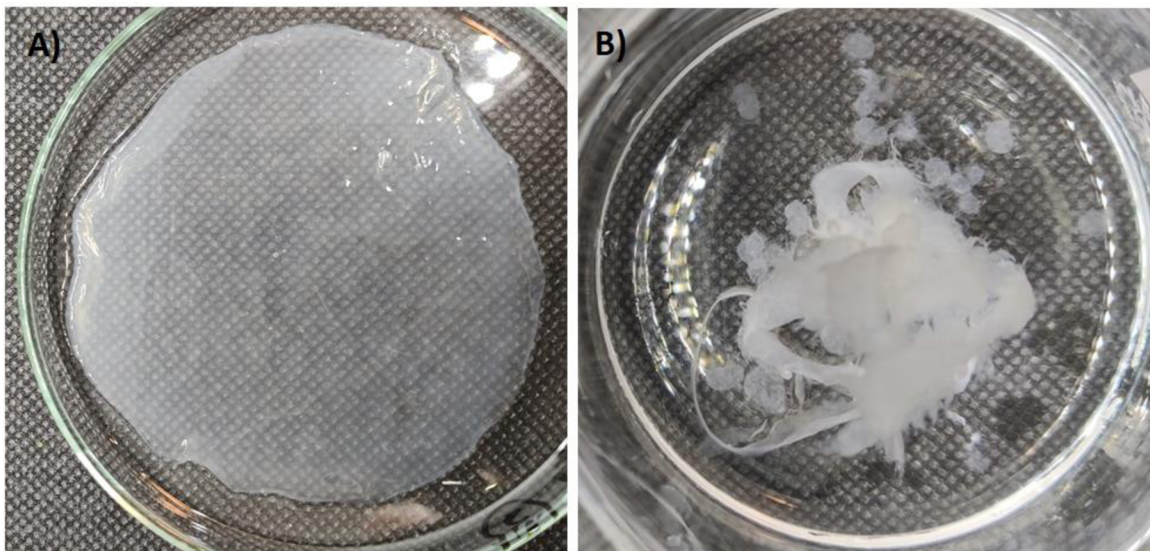
Bakteriální celulóza byla kultivována staticky a dynamicky. Jako zdroj uhlíku byla použita D-glukosa a pH se rovnalo 5. Obě kultivace probíhaly 14 dnů při teplotě 30°C. Dynamická kultivace byla uskutečněna pomocí inkubované třepačky při 150 rpm. Výtěžnost bakteriální celulózy po lyofilizaci a za těchto podmínek můžeme vidět na *Obrázku 13*. Značení SK1 až SK3 znamená zkratku statické kultivace třech vzorků a DK1 až DK3 dynamické kultivace třech vzorků.



Obrázek 13: Výtěžnost BC při statické a dynamické kultivaci v mg na liter média

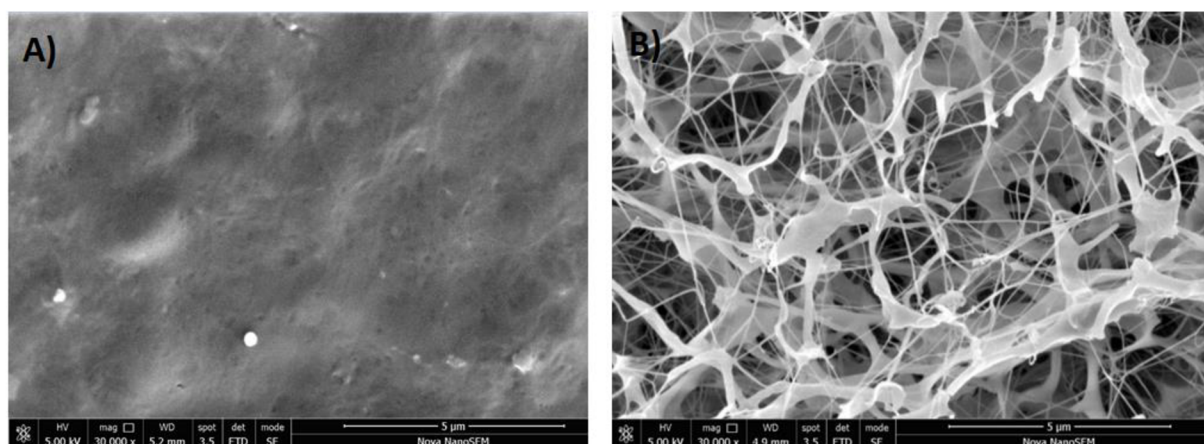
Výtěžek při kultivaci za statických podmínek je u prvních dvou vzorků daleko vyšší než při kultivaci agitované. U třetího výsledku se dynamicky vyprodukovaná celulóza srovnává s výsledky staticky produkované celulózy. Výsledek dokazuje nevyzpytatelné chování bakterie, kdy bakterie může být kultivována za stejných podmínek ve třech baňkách a i tak její růst a produkce celulózy může být odlišná. Taky jsme se přesvědčili, že statická kultivace je spolehlivější metoda pro produkci celulózy než dynamická kultivace pomocí inkubované třepačky.

Rozdíly mezi jejich strukturou BC produkovanou staticky a dynamicky byly velmi znatelné. Staticky kultivovaná celulóza byla vyprodukována jako pevná hustá membrána a dynamicky kultivovaná celulóza obsahovala křehká vlákna, která se vzájemně proplétala. Jejich formu po vyčištění lze srovnat na *Obrázku 14*.



Obrázek 14: Struktura vyprodukované BC po kultivaci A) statickou metodou; B) dynamickou metodou

Dále póry, které se vytvořily ve skafoldu celulózy byly u dynamické kultivace větší a jejich velikost se pohybovala od 0,36 μm do 6,16 μm . Póry celulózy produkované staticky byly veliké okolo 0,05 μm až 0,3 μm . Pórovitost celulózy můžeme vidět na *Obrázku 15*.



Obrázek 15: Struktura bakteriální celulózy kultivované A) staticky; B) dynamicky

Podle literatury by produkce BC pomocí dynamické kultivace měla být vyšší než pomocí statické kultivace. Je to díky neustálé aeraci média, kdy přenos kyslíku v kapalině pomáhá k lepšímu růstu a produkci BC [31]. Existuje ale mnoho experimentů, které právě srovnávají statickou a agitovanou kultivaci bakteriální celulózy a shodují se, že výtěžek obou typů kultivace je téměř shodný, nebo dokonce statická produkce celulózy je vyšší než její dynamická produkce. Jak už bylo uvedeno v teoretické části práce tak například vědci Wang, Tavakoli a Tang (2019) zjistili, že při kultivaci bakterie *Gluconacetobacter xylinus* dynamicky a staticky po dobu 120 hodin byla výtěžnost u obou druhů kultivace téměř stejná. Vyprodukovali 1,8 g/l při statické kultivaci a 2 g/l při dynamické kultivaci za použití HS produkčního média [20]. Je teda možné konstatovat, že výsledky předložené bakalářské práce jsou v souladu s poznatkem publikovaným v literatuře.

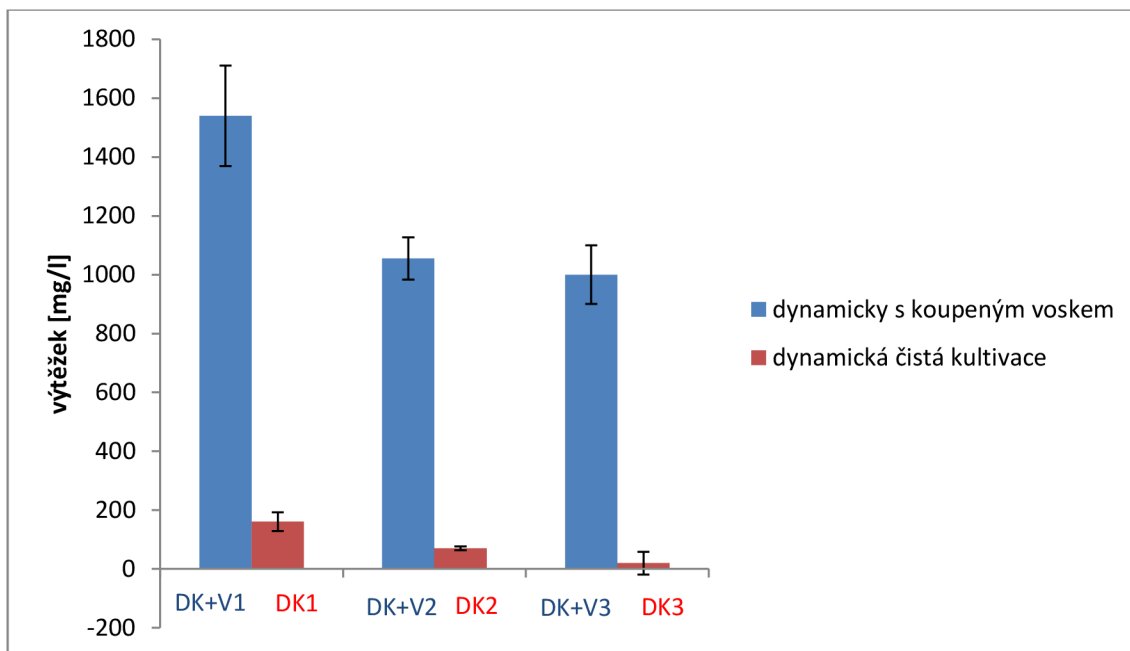
4.1.1 Produkce bakteriální celulózy se sférickou zábranou

Dále byl proveden experiment za účelem zvýšení výtěžku při produkci celulózy pomocí bakterie se sférickou zábranou. Do produkčního média s naočkovanou bakterií byly přidány kousky koupeného syntetického vosku o průměrné velikosti 0,5 cm. Bakterie byla kultivována dynamicky pomocí inkubované třepačky o teplotě 30°C, 150 rpm a po dobu 14 dnů. Vyprodukovanou celulózu s voskem můžeme vidět na *Obrázku 16*.



Obrázek 16: Vyprodukovaný hydrogel BC v médiu s částicemi vosku

Tvarem připomíná celulózu produkovanou za statických podmínek. Forma vzniklého hydrogelu může být následkem malému objemu a plochy média, ve kterém probíhala fermentace bakterie v celulóze. I tak ale výtěžek BC je vysoký. Pro porovnání nejvyšší výtěžek při této kultivaci s přidáním koupeného vosku je skoro až 10x větší než nejvyšší výsledek produkce BC při dynamické kultivaci bakterie bez jakýchkoli přísad. Jejich srovnání lze pozorovat na *Obrázku 17*, přičemž nejvyšší hodnota vyprodukované celulózy byla 1540 mg na jeden litr produkčního média. Zkratka DK+V1 až DK+V 3 znamená dynamická kultivace s přidaným voskem pro tři vzorky a DK1 až DK3 znamená čistá dynamická kultivace bakterie pro tři vzorky. Dále taky bylo zpozorováno, že produkce celulózy roste s vyšším množstvím použitých částic vosku.



Obrázek 17: Srovnání výtěžků vyprodukované BC čistou dynamickou cestou a dynamicky s pomocí kousků vosku

Jak je všeobecně známo, tak vosk je nerozpustný v polárních rozpouštědlech, jako je voda, ale při zvýšené teplotě vosk podléhá stavovým změnám, ve kterých se přeměňuje z pevné látky na přechodovou plastickou formu a následně na kapalnou. Vosk je tedy řazen mezi plastické látky [32]. Při kultivaci o teplotě 30°C a neustálého třepání vosk ztrácel svoji tvrdost a pomalu se měnil ve svou plastickou formu. Hypoteticky je možné předpokládat, že přidavek částic vosku podpořilo aeraci média a tak i životaschopnost bakterie.

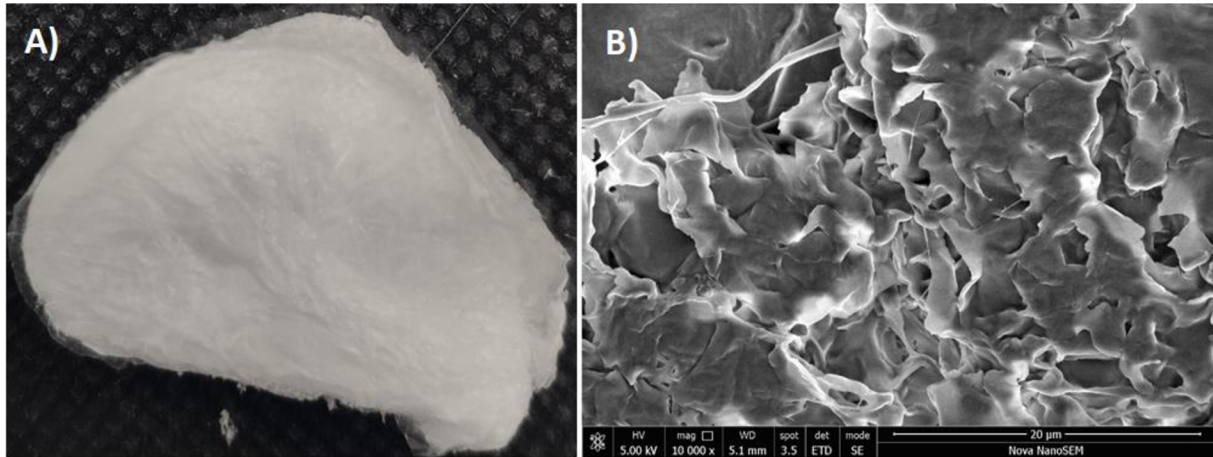
4.2 Příprava mikročástic včelího vosku

Bylo vyzkoušeno několik metod k přípravě ideálních aditiv pro přípravu mikroporézní bakteriální celulózy.

První metoda, která byla vyzkoušena, zahrnovala rozpuštění vosku ve vodní lázni a jeho následné roztříštění v roztoku PVA. Tato metoda nebyla účinná kvůli rychlému tuhnutí vosku, který v roztoku vytvořil velké částice. Další metodou bylo použití homogenizátoru Ultra Turrax, který působil tlakem na roztok PVA a při tom do něj byl přikapáván roztopený vosk. Proces probíhal při otáčkách 6 200 rpm v průběhu 10 minut. Výsledný vzorek byl centrifugován, zmrazen a následně lyofilizován. Vysušený vzorek, ale neodpovídal představě struktury mikročástic, a proto se taková metoda dále taky nepoužila.

Poslední a účinnou metodou bylo rozpuštění včelího vosku ve vhodné organické látce. Byly použity dvě látky – aceton a isopropylalkohol, do kterých byl přidán vosk v poměru

výsledného 1 % roztoku. V obou případech se včelí vosk roztopil, a proto pro nás výhodnější bylo nadále používat roztok s acetonem, protože isopropylalkohol je toxičtější látka a acetonem lze lehce odpařit. Rozpuštěný vosk v acetonu byl následně pomocí injekční stříkačky nastříkán do roztoku PVA, byl lyofilizován a konečným výsledkem byly částice vosku ve formě připomínající netkanou textílii, co můžeme vidět společně s jeho strukturou zachycenou pomocí SEM snímku na *Obrázku 18*. Vytvořené částice vosku měly tvar shluku vláken.



Obrázek 18: A) výsledná forma připraveného vosku; B) jeho SEM snímek

Roztok polyvinylalkoholu byl používán proto, aby podpořil syntézu částic vosku a zabránil jejich opětovného slepení. Jako roztok byl použit při dvou koncentracích, ve kterých se vytvořily mikročástice vosku. Mikročástice vytvořené v 5 hm % roztoku PVA byly na pohled tvrdší a držely více u sebe než částice vosku připravené použitím 0,5 hm % roztoku PVA. Ke kultivaci bakterie pro produkci porézní celulózy byly tedy použity částice vosku, připravené pomocí 0,5 hm % roztoku PVA, se kterými se lépe pracovalo.

4.3 Mikroporézní bakteriální celulóza

Mikroporézní bakteriální celulóza byla vytvořena pomocí přidání vytvořených částic včelího vosku do kultivačního média. Byly vyzkoušeny dva druhy kultivací s cílem produkce porézní celulózy.

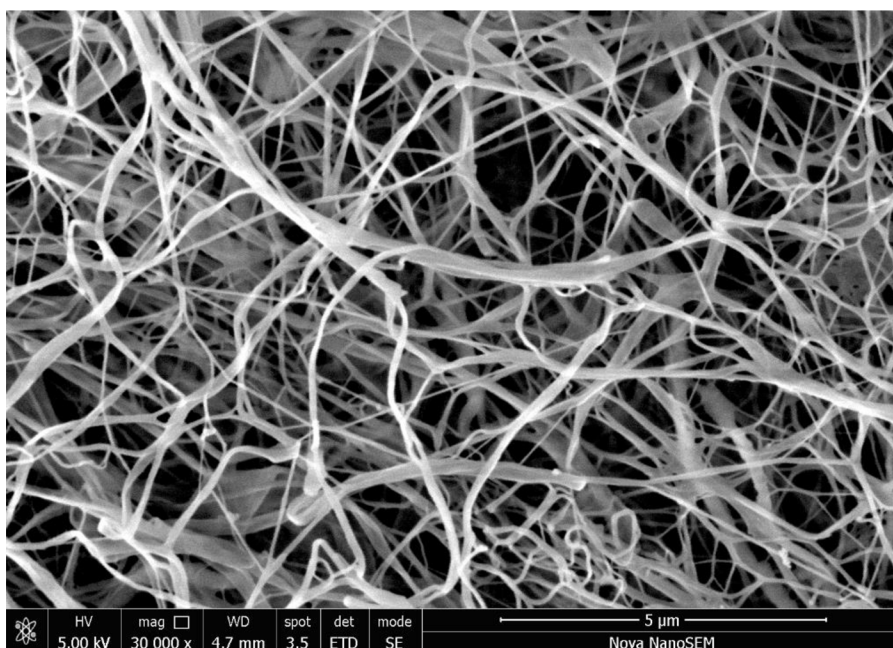
Prvním typem byla statická kultivace bakterie při občasném probublání vzduchem. Kultivace probíhala ve zkumavkách, přičemž jedna zkumavka byla z poloviny zaplněna voskem a druhá z jedné čtvrtiny. Na *Obrázku 19* můžeme vidět naši aparaturu pro kultivaci se vzduchem. Vzduchem bylo médium probubláváno čtyřikrát denně. Vzduch nebylo možno nastavit tak, aby bylo médium aerováno neustále, protože i nejmenší tlak vzduchu působil na malé množství média příliš silně. Právě proto bylo nuceno přijít s jiným typem kultivace porézní BC. Množství vyprodukované a vycištěné BC tímto způsobem je zaznačeno v *Tabulce 3*. Na *Obrázku 20* lze vidět, že tímto způsobem byla vytvořena BC s velmi vysokou pórovitou strukturou.



Obrázek 19: Aparatura pro kultivaci BC ve zkumavkách připojených ke vzduchu

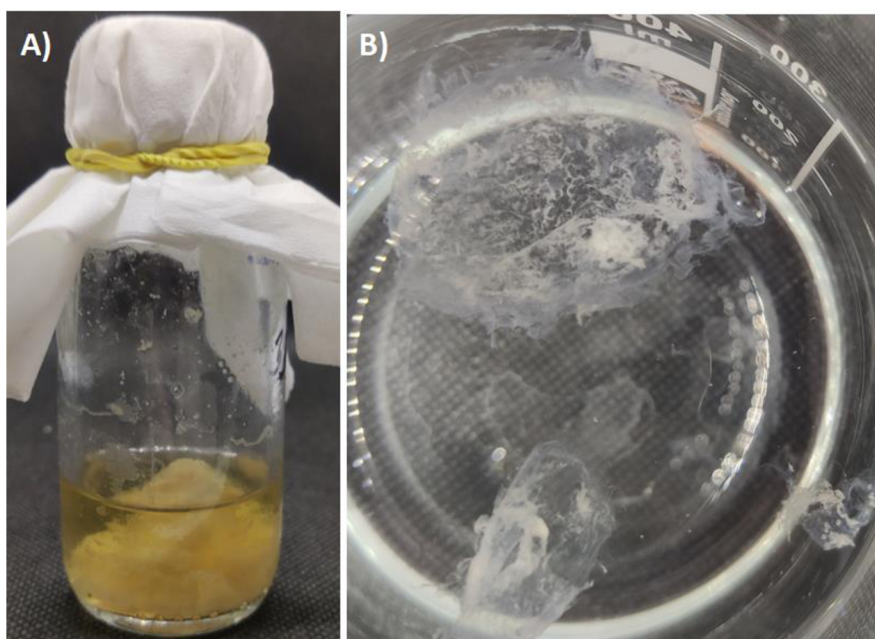
Tab. 3: Tabulka s hodnotami výtěžku BC pro porézní kultivaci pomocí vzduchu

kultivace	kultivační médium [ml]	inokulum [ml]	výtěžek [mg]	voskové částice
statická se vzduchem	2	0,5	0,6	jedna čtvrtina zkumavky
	2	0,5	2	jedna polovina zkumavky



Obrázek 20: Struktura porézní celulózy připravené pomocí kultivace se vzduchem

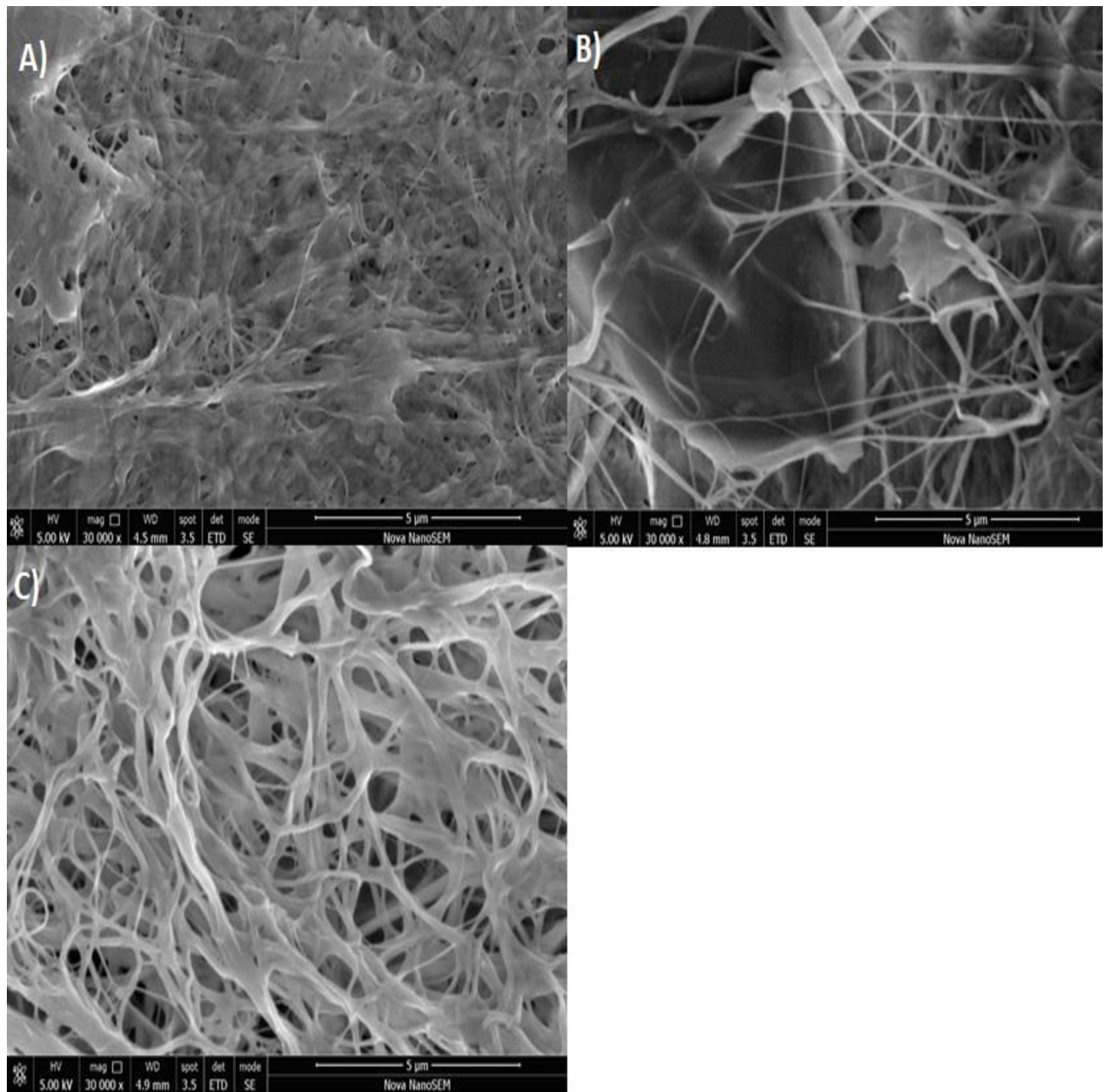
Dalším způsobem fermentace bakterie s cílem produkce porézní bakteriální celulózy byla dynamická kultivace bakteriálního média, ve kterém se nacházely rozmixované voskové částice/vlákná. Kultivace byla prováděna v lahvičkách s médiem o objemu 20 ml pomocí inkubované třepačky při 30°C, 150 rpm a po dobu dvou týdnů. Na *Obrázku 21* lze vidět vyprodukovanou celulózu v médiu před očištěním.



Obrázek 21: A) vyprodukovaná BC v bakteriálním médiu; B) BC s ulpenými částmi vosku ve vláknách

Dále lze na *Obrázku 21* vidět očištěná vlákna celulózy od zachycených bakterií, ve kterých jsou zachyceny částice vosku. Přídavek vosku do kultivačního média změnil v procesu fermentace BC její kompaktní strukturu na pórovitou.

Dynamickou kultivací bylo taky zjišťováno, zdali množství přidaných částic vosku v médiu má vliv na pórovitost konečného produktu celulózy. Na *Obrázku 22* lze vidět struktury pórovitých vláken BC.



Obrázek 22: SEM snímky BC kultivované dynamicky s A) 0,115 g vosku na 20 ml média; B) 0,193 g vosku na 20 ml média; C) 0,253 g vosku na 20 ml média

Bylo zjištěno, že koncentrace použitého vosku na určitý objem média má zásadní vliv na morfologii bakteriální celulózy. Podle těchto SEM snímků lze vidět, že nejpravidelnější struktura pórů a taky nejvyšší pórovitost byla u vzorku C. Vzorek byl kultivován s použitím největšího množství částic vosku, tedy 0,253 g na 20 ml média. Se snižováním koncentrace vosku v médiu pórovitost vyprodukované celulózy se snižovala. Dále je taky ze všech snímků zřetelné, že vosk byl pečlivě odstraněn. Tyto struktury celulózy jsou bez přítomnosti částic vosku. Množství vyprodukované porézní celulózy je zobrazeno v *Tabulce 4*.

Tab. 4: Tabulka s hodnotami vyprodukované porézní BC dynamickou kultivací

značení	kultivace	kultivační médium [ml]	inokulum [ml]	výtěžek [mg]	hmotnost voskových částic [g]
1	dynamická s vytvořenými voskovými částicemi	20	4	6,3	0,253
2	dynamická s vytvořenými voskovými částicemi	20	4	6,3	0,226
3	dynamická s vytvořenými voskovými částicemi	20	4	8,3	0,193
4	dynamická s vytvořenými voskovými částicemi	20	4	6,7	0,115
5	dynamická s vytvořenými voskovými částicemi	20	4	4,9	0,095

5. Závěr

Bakalářská práce obsahuje literární rešerši na téma bakteriální celulózy, její produkce, typy kultivace a její porozitu. Bakteriální celulóza je velmi kompatibilní materiál a dá se aplikovat ve velké škále odvětví od průmyslu po lékařství. V lékařství se právě zkouší různé pokusy, ve kterých by mohla porózní bakteriální celulóza nahradit pojivové tkáň. Právě její póry jsou důležitým aspektem. Díky nim by byly umožněny důležité životní pochody jako například transport živin do buněk nebo přímá migrace buněk.

Cílem experimentální části této práce bylo zvýšit porozitu skafoldu bakteriální celulózy. Tomuto pokusu bylo docíleno přidáním vytvořených voskových částic do média s bakterií, kdy v procesu fermentace bakterie produkovala celulózu, která rostla okolo částic vosku. Po vyčištění vyprodukované celulózy bylo pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu vidět póry ve vláknu celulózy, které tam zanechaly částice vosku. Experimentem bylo dokázáno, že lze ovlivnit porozitu BC pomocí použití určitých sférických zábran při její fermentaci. Pro navázání a vylepšení tohoto experimentu by bylo vhodné připravit aditiva o jednotném rozměru, přičemž by výsledné póry ve vláknu celulózy měly stejný tvar a velikost.

Dále byl proveden experiment, při kterém byly použity větší částice syntetického vosku při dynamické kultivaci bakteriální celulózy s cílem využití sférické zábrany a tak podpořit aeraci média s kultivovanou bakterií. Bylo zjištěno, že částice vosku ve formě kuliček o průměru 0,5 cm zvýší viskozitu kultivačního média a produkce BC je až 10x větší než její produkce pomocí dynamické kultivace bez přidání jakýchkoli aditiv. Navazující experimenty by se mohly zaměřit právě na zvýšení produkce BC pomocí různých sférických zábran.

6. Literární zdroje

- [1] Dhawan A.: *Synthesis of block copolymers from cellulose nanoparticles via atom transfer radical polymerization*, Thesis, **2007**, North Carolina State University
- [2] LEE, Byoung-Ho, Hyun-Joong KIM a Han-Seung YANG. *Polymerization of aniline on bacterial cellulose and characterization of bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite films*. *Current Applied Physics*. 2007, **2012**, 75-80. DOI:10.1016/j.cap.2011.04.045 Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567173911002562>
- [3] ROSS, P., MAYER, R. a BENZIMAN, M. *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **1991**, 55, 1, 35–58. DOI: 10.1128/MMBR.55.1.35-58.1991
- [4] CZAJA, W., ROMANOVICZ, D. a BROWN, R. *Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture*. *Cellulose*, 11(3/4), **2004**, 403–411. DOI:10.1023/b:cell.0000046412.11983.61
- [5] CZAJA, W., KRYSZYNOWICZ, A., BIELECKI, S. a BROWNJR, R. *Microbial cellulose—the natural power to heal wounds*. *Biomaterials*, 27(2), **2006**, 145–151. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.07.035. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205007040>
- [6] CZAJA Wojciech, David YOUNG, Marek KAWECKI a Malcolm BROWN. *The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications*. *Biomacromolecules* 8 (1), **2007**, 1-12, DOI: 10.1021/bm060620d Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205007040>
- [7] LUDWICKA, Karolina, Marzena JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, Marek KOŁODZIEJCZYK, Teresa PANKIEWICZ a Stanisław BIELECKI. *Medical and Cosmetic Applications of Bacterial NanoCellulose*. *Bacterial Nanocellulose*, Elsevier, **2016**, 145-165, ISBN 9780444634580. DOI: 10.1016/B978-0-444-63458-0.00009-3. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634580000093>
- [8] CHAWLA, Prashant, Ischwar BAJAJ, Schrikant SURVASE a Rekha SINGHAL. *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*. *Food Technology and Biotechnology* 47, **2009**, 107-124, ISSN 1330-9862
- [9] SHI, Zhijun,, Yue ZHANG, Glyn PHILIPS a Guang YANG. *Utilization of bacterial cellulose in food*. *Food Hydrocolloids* 35, **2014**, 539-545, ISSN 0268-005X, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.012. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13002142>
- [10] FILLAT, Amanda, Josefina MARTÍNEZ, Cristina VALLS a Oriol CUSOLA. *Bacterial cellulose for increasing barrier properties of paper products*. *Cellulose* 25, **2018**, 6093–6105. DOI: 10.1007/s10570-018-1967-0.

- [11] ESA, Faezah, Siti TASIRIN a Norliza RAHMAN. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2, **2014**, 113-119. DOI: 10.1016/j.aaspro.2014.11.017. ISSN 22107843. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210784314000187>
- [12] RUKA, Dianne R., George P. SIMON a Katherine M. DEAN. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), **2012**, 613–622, ISSN 0144-8617. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.03.059. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171200286X>
- [13] TARR, H. L. A. a Harold HIBBERT. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharides synthesis by the action of *Acetobacter xylinus* on carbohydrates and related compounds. *Canadian Journal of Research*, 4(4), 1931, 372–388. DOI:10.1139/cjr31-027
- [14] REVIN, Victor, Elena LIYASKINA, Maria NAZARKINA, Alena BOGATYREVA a Mikhail SHCHANKIN. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 (1), **2018**, 151-159, ISSN: 1517-8382, DOI: 10.1016/j.bjm.2017.12.012. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S151783821730134X>
- [15] HUSSAIN, Zohaib, Wasim SAJJAD, Taous KHAN, a Fazli WAHID. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26, **2019**, 2895–2911. DOI:10.1007/s10570-019-02307-1. Dostupné také z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-019-02307-1>
- [16] ATYKYAN, Nelli, Victor REVIN a Vitalina SHUTOVA. Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media. *AMB Express* 10, **2020**, 84. DOI:10.1186/s13568-020-01020-8. Dostupné také z: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-01020-8>
- [17] LIU, Miao, Siqi LI, Yongzhen Xie, Shiru JIA, Ying HOU, Yang ZOU a Cheng ZHONG. Enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and oxygen tension regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), **2017**, 1155–1165. DOI:10.1007/s00253-017-8680-z.
- [18] WU, Sheng-Chi a Meng-Hsun LI. Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 120, Issue 4, **2015**, 444-449, ISSN 1389-172. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.02.018. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172315000961>
- [19] PRADO BARRAGÁN L. A., J. J. B. FIGUEROA, L.V. RODRÍGUEZ DURÁN, C. N. AGUILAR GONZÁLES, C. HENNIGS. Kapitola 7 - Fermentative Production Methods, Editor(s): Palmiro Poltronieri, Oscar Fernando D'Urso, *Biotransformation of Agricultural Waste and By Products*, Elsevier, **2016**, 189-217, ISBN 9780128036228. DOI: 10.1016/B978-0-12-803622-8.00007-0. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128036228000070>

- [20] WANG, Jing, Javad TAVAKOLI a Youhong TANG. *Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods. A review*, *Carbohydrate Polymers*, Volume 219, **2019**, 63-76, ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719305041>
- [21] SHAMEER, P. Mohamed a P. Mohamed NISHATH, Kapitola 8 - *Exploration and enhancement on fuel stability of biodiesel: A step forward in the track of global commercialization*, Editor(s): Abul Kalam Azad, Mohammad Rasul, In *Woodhead Publishing Series in Energy, Advanced Biofuels*, Woodhead Publishing, **2019**, 181-213, ISBN 9780081027912, DOI: 10.1016/B978-0-08-102791-2.00008-8. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081027912000088>
- [22] ATYKYAN, Nelli, Victor REVIN a Vitalina SHUTOVA. *Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria Gluconacetobacter sucrofermentans during the different regimes of cultivation on a molasses media*. *AMB Express* 10, **2020**, 84. DOI:10.1186/s13568-020-01020-8. Dostupné také z: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-01020-8>
- [23] KUURE-KINSEY, M., WEBER, D., BUNGAY, H. R., PLAWSKY, J. L., & BEQUETTE, B. W. (n.d.). *Modeling and predictive control of a rotating disk bioreactor*. *Proceedings of the 2005, American Control Conference*, **2005**. DOI:10.1109/acc.2005.1470474
- [24] ZABOROWSKA, Magdalena, Aase BODIN, Henrik BÄCKDAHL, Jenni POPP, Aaron GOLDSTEIN, Paul GATENHOLM. *Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration*. *Acta Biomaterialia* 6 (7), **2010**, 2540-2547, ISSN 1742-7061, DOI:10.1016/j.actbio.2010.01.004. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706110000085>
- [25] YIN, Na, Matthew D. STILWELL, Thiago M. A. SANTOS, Huaping WANG a Douglas B. WEIBEL. *Agarose particle-templated porous bacterial cellulose and its application in cartilage growth in vitro*. *Acta Biomaterialia*, 12, **2015**. 129–138. DOI:10.1016/j.actbio.2014.10.019. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706114004619>
- [26] MARQUEZ, Ronald, BÁLSAMO, MORALES, RUIZ, GARCÍA, LEÓN, MONTES, NAVA, NOGUERA, QUINERO, ZAMBRANO, MONTOYA, OSTOS, ROSALES, ARAUJO, CANIZALES, LEMA, MASCARELL, SANTIANA, TOLOSA a LAURA. *Technological use of beeswax for obtaining organic products, non-toxic for the human being*. *Artículo de Investigación* 40(1), 17-26, **2019**, ISSN 1316-7081
- [27] TITUS Deena, E. James Jebaseelan SAMUEL, Selvaraj Mohana ROOPAN. Kapitola 12 - *Nanoparticle characterization techniques*. Editor(s): Ashutosh Kumar Shukla, Siavash Irvani. In *Micro and Nano Technologies, Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, Elsevier, **2019**, 303-319, ISBN 9780081025796, DOI: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5.

[28] ANDERSSON, Jessica, Hanna STENHARME, Henrik BACKDAHL a Paul GATENHOLM. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* 94(4), 1124-32, 2010. PMID: 20694979, DOI: 10.1002/jbm.a.32784. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20694979/>

[29] CHEN Si-Qian, Xiao CAO, Zhaofeng LI, Jie ZHU, Lin LI. Effect of lyophilization on the bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter* strains to adsorb epicatechin. *Carbohydrate Polymers*, 246, 2020, 116632, ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116632. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720308067>

[30] ADEL, Abeer, H. ABOU-YOUSSEF, Ahmed El-Gendy a A. M. NADA. Carboxymethylated Cellulose Hydrogel; Sorption Behavior and Characterization. *Nature and Science*. 8. 2010

[31] PODDAR, Maneesh a Pritam Kumar DIKSHIT. Recent development in bacterial cellulose production and synthesis of cellulose based conductive polymer nanocomposites. *Nano Select*. 2021, DOI: 10.1002/nano.202100044. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/nano.202100044>

[32] BEELEY P. R., R. F. SMART, *Investment Casting*. Cambridge: University Press, 1995.

7. Seznam použitých zkratek

BC – bakteriální celulóza

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

PVA – polyvinylalkohol

REM – rastrovací elektronový mikroskop

HS médium – Hestrin a Schramm médium