



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PRODUKCE 3D BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY ZA VYUŽITÍ BANÁNOVÝCH SLUPEK JAKO UHLÍKOVÉHO ZDROJE

STUDY OF 3D BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION USING BANANA PEELS AS A CARBON SOURCE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tibor Netopilík

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík,
Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1718/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student: **Tibor Netopilík**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a analýza přírodních látek

Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium produkce 3D bakteriální celulózy za využití banánových slupek jako uhlíkového zdroje

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Enzymatická hydrolyza banánových slupek za účelem izolace cukrů.
3. Studium produkce bakteriální celulózy pomocí bakterie *Gluconacetobacter xylinus* za použití uhlíkového zdroje izolovaného z banánových slupek.
4. Porovnání statické a dynamické produkce bakteriální celulózy.
5. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Tibor Netopilík
student

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem produkce 3D bakteriální celulózy pomocí bakterie *Komagataeibacter xylinus* za využití banánových slupek jako zdroje uhlíku. V teoretické části se zabývá porovnáním vlastností bakteriální celulózy a rostlinné celulózy, různými způsoby biotechnologické produkce bakteriální celulózy a jejím využitím. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda je možné použít banánové slupky jako uhlíkový zdroj pro biotechnologickou produkci bakteriální celulózy. Banánové slupky jsou odpadním lignocelulózovým materiálem vznikajícím například při výrobě přesnídávek anebo ovocných případně mléčných nápojů v potravinářském průmyslu. HPLC analýza ukázala, že 1 l hydrolyzátu po enzymatické hydrolýze 100 g suchých banánových slupek na 1 l vody obsahoval 8,86 g glukózy a 10,46 g fruktózy. Hydrolyzát byl použitý jako uhlíkový zdroj pro statickou a dynamickou kultivaci bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Výtěžky bakteriální celulózy získané produkcí na hydrolyzátu byly porovnané s produkcí za použití glukózy. Zjistilo se, že použití hydrolyzátu příznivě ovlivnilo výtěžky o 170 % v případě statické kultivace a o 220 % v případě dynamické kultivace. Morfologická analýza pomocí SEM potvrdila rozdíly mezi bakteriální celulózą produkovanou staticky a dynamicky. Vliv druhu uhlíkového zdroje na morfologii bakteriální celulózy byl též patrný.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of 3D bacterial cellulose production using *Komagataeibacter xylinus* using banana peels as a carbon source. The theoretical part deals with the comparison of the properties of bacterial cellulose and plant cellulose, different methods of biotechnological production of bacterial cellulose and its use. The aim of the bachelor thesis was to find out whether it is possible to use banana peel as a carbon source for biotechnological production of bacterial cellulose. Banana peels are waste lignocellulosic material produced, for example, in the production of snacks or fruit or dairy beverages in the food industry. HPLC analysis showed that 1 l of hydrolyzate after enzymatic hydrolysis of 100 g of dry banana peels per 1 l of water contained 8.86 g of glucose and 10.46 g of fructose. The hydrolyzate was used as a carbon source for static and dynamic cultivation of *Komagataeibacter xylinus*. The yields of bacterial cellulose produced by using banana peels or glucose were compared. The use of banana peels hydrolyzate increased the yields of bacterial cellulose about 170 % in the case of static cultivation and about 220 % in the case of dynamic cultivation. Scanning electron micrographs of bacterial cellulose confirmed the morphological differences between bacterial cellulose produced statically and dynamically. Moreover, the morphology of bacterial cellulose was influenced by the kind of used carbon source.

KLÍČOVÁ SLOVA

Komagataeibacter xylinus, bakteriální celulóza, kultivace, hydrolýza banánových slupek

KEY WORDS

Komagataeibacter xylinus, bacterial cellulose, cultivation, hydrolysis of banana peels

NETOPILÍK, Tibor. *Studium produkce 3D bakteriální celulózy za využití banánových slupek jako uhlíkového zdroje* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138200>. 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

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Adrianě Kovalčík PhD., za příležitost pracovat na zajímavém tématu, ochotu, čas a pomoc při zpracování této práce. Také bych chtěl velmi poděkovat svému školiteli Ing. Radimu Střížovi, za jeho ochotu a odborné rady při vypracovávání této bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	CELULÓZA	7
2.2	BAKTERIÁLNÍ CELULÓZA	9
2.2.1	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	11
2.2.2	<i>Produkce bakteriální celulózy</i>	12
2.2.3	<i>Využití bakteriální celulózy</i>	19
2.3	POTRAVINÁŘSKÝ ODPAD	23
2.4	BANÁNY	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MIKROORGANISMY	26
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	26
3.3	KULTIVACE A PRODUKCE BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY	27
3.4	ANALYTICKÉ METODY	29
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	ANALÝZA HYDROLYZÁTU Z BANÁNOVÝCH SLUPEK	31
4.1.1	<i>Stanovení cukru</i>	31
4.1.2	<i>Stanovení polyfenolů a flavonoidů</i>	32
4.2	PRODUKCE BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY	32
4.3	MORFOLOGIE VZORKŮ BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY	37
5	ZÁVĚR	39
6.	Literární zdroje	40
7.	Seznam použitých zkratk	44

1 ÚVOD

V posledních letech roste poptávka po levných surovinách, obnovitelných zdrojích a ekologických produktech. Je tedy potřeba vyvinout biologicky odbouratelné materiály, které by nahradily syntetické produkty z ropy. Je to další krok k udržitelnému chemickému průmyslu, který respektuje životní prostředí.

Celulóza je rozšířený přírodní materiál a nachází se v buněčných stěnách rostlin. Pro svou obnovitelnost má celulóza rostlinného původu široké komerční využití, a to zejména v papírenském a textilním průmyslu. Avšak nadměrná těžba z přírodních zdrojů má neblahý dopad na životní prostředí.

Bakteriální celulóza je přírodní biopolymer, který je produkován několika bakteriálními rody, zejména *Komagataeibacter xylinus*. Je produkována ve velmi vysoké čistotě, nevyžaduje tak náročné procesy k odstranění nežádoucích nečistot, jako je lignin, pektin a hemicelulóza. Má pozoruhodné fyzikální a chemické vlastnosti a lze ji kultivovat do požadovaného tvaru a struktury, tak aby vyhovovala potřebám různých aplikací. Je biokompatibilní, a tak je stále častěji využívána v medicíně, potravinářství a kosmetice. Také je to biologicky odbouratelný materiál a její výroba nezatěžuje životní prostředí, stejně jako odpady z ní.

V souladu se soudobými trendy, kdy se hledá další využití stále více vyprodukovaných odpadů, na výrobu bakteriální celulózy lze využít mnohý organický odpadní materiál z potravinového průmyslu jako levný zdroj uhlíku. Jedná se o materiál bohatý na cukry, jako jsou odpadní zbytky různých druhů ovoce. Takovým materiálem mohou být i banánové slupky. Až jednu třetinu hmotnosti banánu činí právě slupka, která je stále bohatá na živiny. Tak vzniká velké množství odpadu, který lze ještě využít, třeba na výrobu bakteriální celulózy.

Navzdory benefitům, se kterými se využívání bakteriální celulózy pojí, má i své limitující faktory. Zejména vyšší výrobní náklady, časová náročnost a náchylnost na kontaminaci při výrobním procesu. Z těchto důvodů je její využití pro průmyslovou výrobu velmi omezené.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium produkce bakteriální celulózy pomocí bakterie *Komagataeibacter xylinus* za použití uhlíkového zdroje izolovaného z banánových slupek a porovnání statické a dynamické produkce bakteriální celulózy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

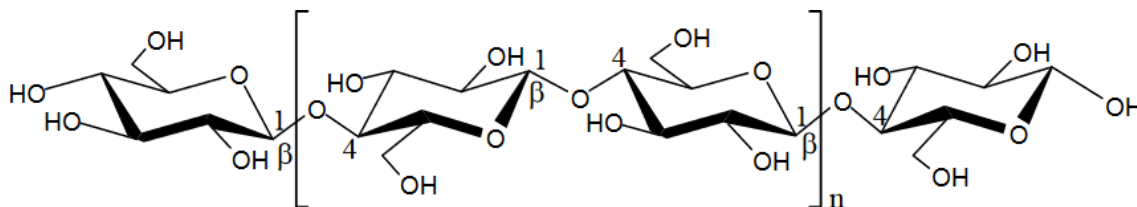
2.1 CELULÓZA

Celulóza je nejvýznamnějším strukturálním polysacharidem. Jedná se o nejrozšířenější organickou látku na Zemi, její přirozená produkce se odhaduje na cca 10^{15} kg ročně. Lze ji nalézt v mnoha rostlinných tkáních, ale i v některých živých organismech, jako jsou sinice, řasy, houby a bakterie. Celulóza je primární strukturální složkou buněčných stěn vyšších rostlin a je syntetizována enzymovými komplexy, tzv. celulóza syntázami. V primární buněčné stěně je zastoupena v množství kolem 20 %. Její zdroje jsou tedy velmi rozmanité, a představují tak prakticky nevyčerpatelný zdroj obnovitelné energie [1].

Z důvodu absence enzymového aparátu nutného k rozrušení $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby není člověk schopen celulózu trávit, proto pro člověka nemá kalorickou hodnotu. Přesto má svou nenahraditelnou úlohu ve výživě, z dietetického hlediska se jedná o vlákninu [2].

Hydrolyzovat celulózu jsou schopny pouze organismy produkující enzym zvaný *celuláza*. Takové organismy jsou přítomny v zažívacím traktu přežvýkavců a termitů, díky kterým jsou schopni celulózu trávit [2].

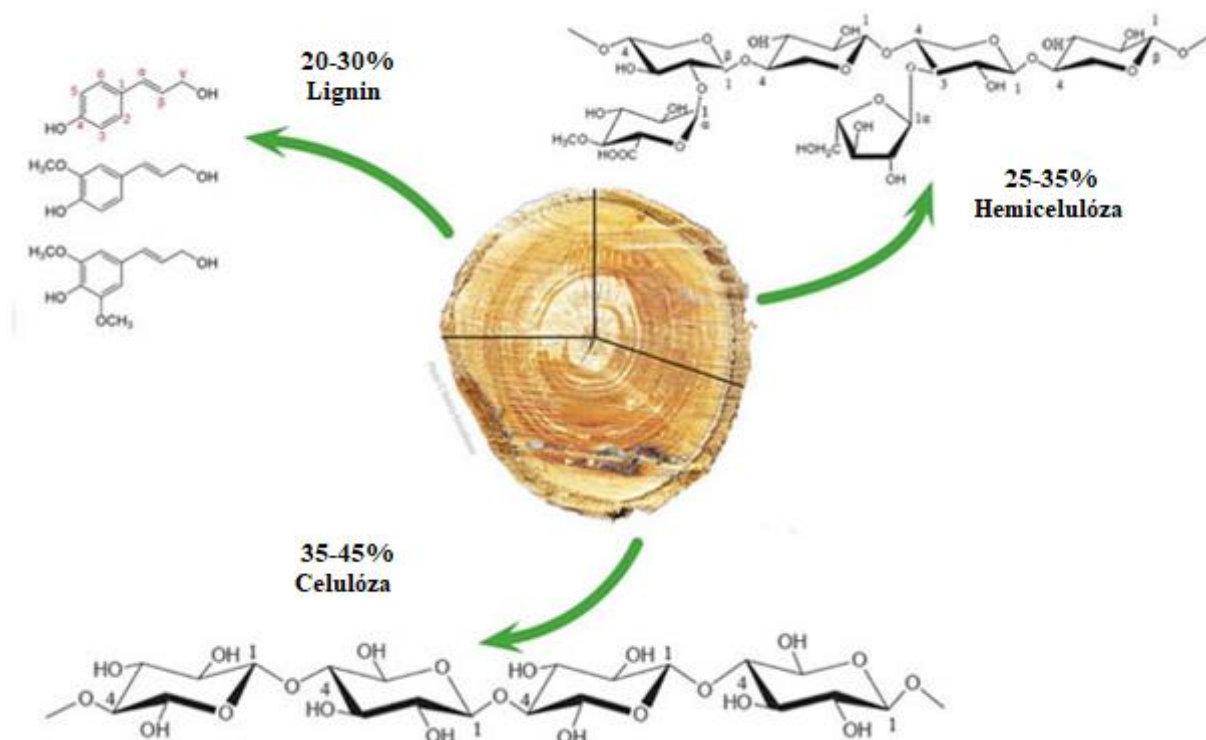
Celulóza je nevětvený homopolymer s vysokým stupněm polymerizace. Základní monomerní jednotkou je β -D-glukóza, monomery jsou vzájemně spojeny β -1,4 glykosidickou vazbou, která způsobuje tyčinkovitý charakter celulózy. Dimerem tvořící celulózu je celobióza, složená ze dvou jednotek glukózy. Obecná struktura celulózy je zobrazena na Obrázek 1 [2].



Obrázek 1: Molekulová struktura celulózy [1]

Lineární molekuly celulózy obsahují každá 12 000 monomerních jednotek, jsou vzájemně propojeny vodíkovými můstky a vznikají tak vlákna typu skládaného listu, nazývané mikrofibrily. Svazek mikrofibril je tvořen cca čtyřiceti vlákny. Lineární řetězce vzájemně propojené β -1,4 vazbami tvoří vlákna s mimořádnými vlastnostmi a vyznačujícími se značnou pevností. Nerozpouští se ve vodě, ale jsou hydrofilní. Voda se může navázat na celulózu díky vodíkovým vazbám, což umožňuje absorbovat velké množství vody. Chemicky je velmi stabilní a odolná vůči rozkladu. Pro své strukturální vlastnosti je celulóza významným ekonomickým artiklem, je součástí komodit jako jsou dřevo, papír, bavlna aj. [2].

V rostlinných tkáních je celulóza propojena s dalšími složkami, jako jsou hemicelulóza, lignin, pektin, bílkoviny, lipidy a minerální látky. Nejvíce zastoupené složky lignocelulózy jsou naznačeny na Obrázek 2 [2].



Obrázek 2: Nejvíce zastoupené složky lignocelulózy [2]

Hemicelulóza

Jedná se o lineární polysacharid s krátkými postranními řetězci, který se od celulózy liší molekulovou hmotností a chemickou stavbou. Řetězec je složen z glukózy, ale i dalších monosacharidů. To mohou být hexózy, jako manóza a galaktóza, ale i pentózy (arabinóza, xylóza), uronové kyseliny, popřípadě i různé cukerné deriváty. Hemicelulóza se vyskytuje společně s celulózou v jednotlivých vrstvách buněčných stěn, tvoří tmelící vrstvu mezi celulózovými řetězci a váže se na ni lignin. Ze dřeva ji lze extrahovat pomocí zředěných alkálií a hydrolyzovat kyselinami za tepla [2].

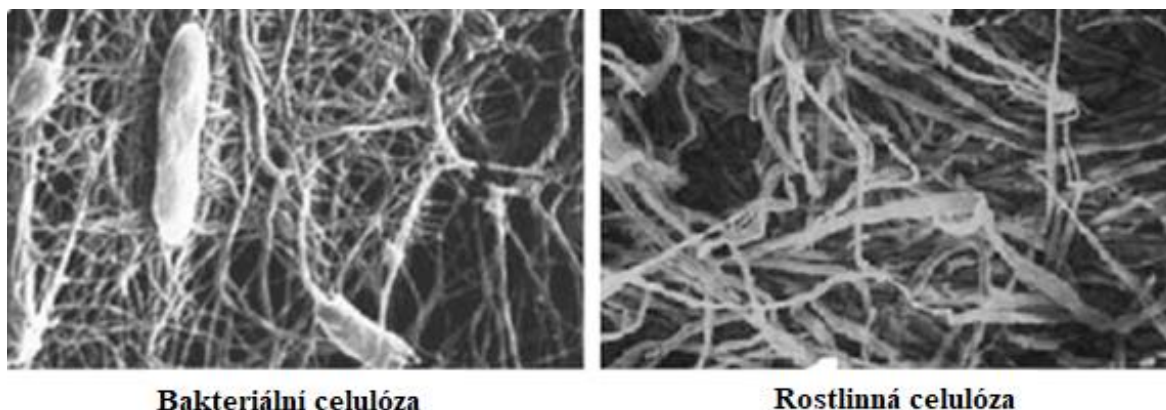
Lignin

V největším zastoupení se vyskytuje v sekundární buněčné stěně rostlin, plní zde hydrofobní funkci. Spojuje mezibuněčná vlákna a zpevňuje celulózová vlákna v buněčné stěně. Jedná se o vysokomolekulární polyfenolickou amorfni látku, jejíž základní stavební jednotkou jsou deriváty fenylypropanu (p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol), které jsou vázány do trojrozměrných struktur. Na rozdíl od jiných přírodních biopolymerů postrádá pravidelnou strukturu s opakujícími se jednotkami. Nejedná se tedy o samostatnou sloučeninu, ale o směs fyzikálně a chemicky heterogenních látek. Tepelně je málo stálý, rozkládá se již při cca 140 °C, důsledkem jeho rozkladu je hnědnutí dřeva [2].

2.2 BAKTERIÁLNÍ CELULÓZA

Bakteriální celulóza je vysoce krystalická extracelulární nanocelulóza produkovaná typem bakterií patřících do rodů *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* nebo *Sarcina*, přičemž nejprozkoumanější a nejvyšších výtěžků dosahuje bakterie *Komagataeibacter xylinus* (dříve *Acetobacter xylinus*). Nicméně lze použít i geneticky modifikované kmeny bakterií k lepším výtěžkům BC [3].

BC vzbudila zájem díky vysoké čistotě, nepřítomnosti ligninu a hemicelulózy. Z tohoto důvodu nevyžaduje náročné chemické čištění. Jinak je po chemické stránce identická s rostlinnou celulózou. Dalšími výhodami BC oproti RC jsou velký povrch na jednotku, vysoký stupeň krystalinity, biologická rozložitelnost, obnovitelnost, biokompatibilita, velké množství zadržené vody a pevnost v tahu [4,5].



Obrázek 3: Porovnání mikroskopické struktury bakteriální a rostlinné celulózy [7]

Vlastnosti i struktura celulózy vyrobené bakteriálně a získané z lignocelulóзовého materiálu se značně liší. Rozdílnost v mikroskopické struktuře je patrná na Obrázek 3. Fyzikální vlastnosti bakteriální celulózy v mnoha ohledech převyšují celulózu rostlinného původu. BC má vyšší pevnost v tahu, vyšší stupeň krystalinity, má schopnost zadržovat větší množství vody a je produkována ve vyšší čistotě. Porovnání vlastností bakteriální celulózy a rostlinné celulózy je uvedeno v Tabulka 1 [4].

Tabulka 1: Srovnání vlastností bakteriální a rostlinné celulózy [4]

Vlastnosti	Bakteriální celulóza	Rostlinná celulóza
Pevnost v tahu (MPa)	20–30 000	25–200
Youngův modul (MPa)	Pelikulum: 20 000 Jedno vlákno: 130 000	2,5–0,17
Kapacita zadržování vody (%)	> 95	25–35
Velikost vláken (nm)	20–100	Několik mikrometrů
Krystalinita (%)	74–96	40–85
Relativní hydrofilita (%)	40–45	20–30
Čistota (%)	>99	<80
Stupeň krystalizace	14 000–16 000	300–10 000
Pórovitost (%)	>85	<75
Celková plocha (m ² /g)	>150	<10

[illegible]

Základní struktura β -1,4-glukanových řetězců je vzájemně propojena vodíkovými můstky a dojde k vytvoření 3D struktury. Vlákna vytvoří vysoce porézní síťovou strukturu. Díky velkému povrchu a vysoké koncentraci hydrofilních hydroxylových skupin má bakteriální celulóza schopnost vázat velké množství vody a poskytuje materiál podobný hydrogelu [7].

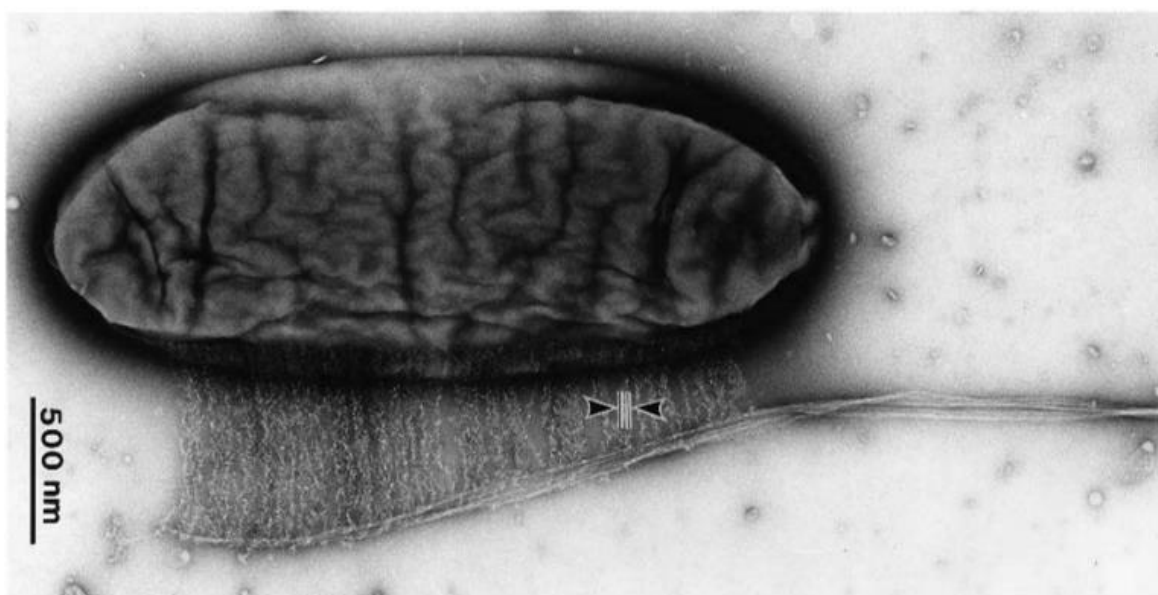
Pro dosažení lepších vlastností se BC různě modifikuje. Pro antibakteriální účinek se používají stříbrné nano částice, aminoalkylace, modifikace chitosanem oxidem grafenu a oxidem titaničitým. Modifikovaná BC se využívá jako obalový materiál nebo ke krytí ran [8].

2.2.1 *Komagataeibacter xylinus*

Bakterie *Komagataeibacter xylinus* je známá také pod názvy *Gluconacetobacter xylinus* a *Acetobacter xylinus*. Jde o producenta BC s nejvyššími výtěžky, je využíván ve výzkumu i komerční výrobě, a to zejména díky své nepatogenitě. Tento typ bakterií je gram negativní, aerobní, mezofilní, nefotosyntetizující a dokáže přeměnit glukózu a další organické substráty na celulózu během několika dnů. Bylo pozorováno, že jedna bakterie dokáže přeměnit 108 molekul glukózy za hodinu na celulózu. Syntéza bakteriální celulózy probíhá v plazmatické membráně na povrchu buněk bakterií [4].

Bakterie vytváří biofilm jako ochranu před germicidním účinkem UV záření. Celulóza je sekundární metabolit, kyselina octová, která je primárním metabolitem, vytváří optimální podmínky pro bakteriální růst. Bakterie je schopna kyselinu octovou oxidovat na oxid uhličitý a vodu, pokud by byl sacharid ve fermentačním médiu zcela metabolizován. Ideální podmínky pro kultivaci je mírně kyselé pH, teplota 28 až 30°C a médium se zdrojem uhlíku (sacharidy). [9]

Bakterie *Komagataeibacter xylinus* je zobrazena pomocí elektronové mikroskopie na Obrázek 5.



Obrázek 5 - *Komagataeibacter xylinus* pod elektronovým mikroskopem [9]

Zdrojem uhlíku pro kultivaci BC jsou sacharidy. Avšak některé typy cukrů mají za následek vyšší produkci celulózy než jiné. Nejvhodnější, a tedy i nejvýtečnější, se ukázaly monosacharidy glukóza, fruktóza a mannitol. Ovšem vyššího výtěžku obecně dosahují hexózy. BC může být kultivována na jakékoli surovině obsahující jednoduché cukry, mezi nejběžnější suroviny použité při produkci jsou kokosová voda, cukrová třtina nebo ovocné šťávy jako je ananasová šťáva, meloun, grapefruit, guava a banánová nebo hroznová slupka [9].

Disacharidy, jako jsou laktóza, sacharóza a maltóza, vedou také k tvorbě celulózy, avšak v mnohem menší míře a doba syntézy je delší, neboť je nutný předcházející metabolický krok, kdy se disacharidy štěpí na monosacharidy [10].

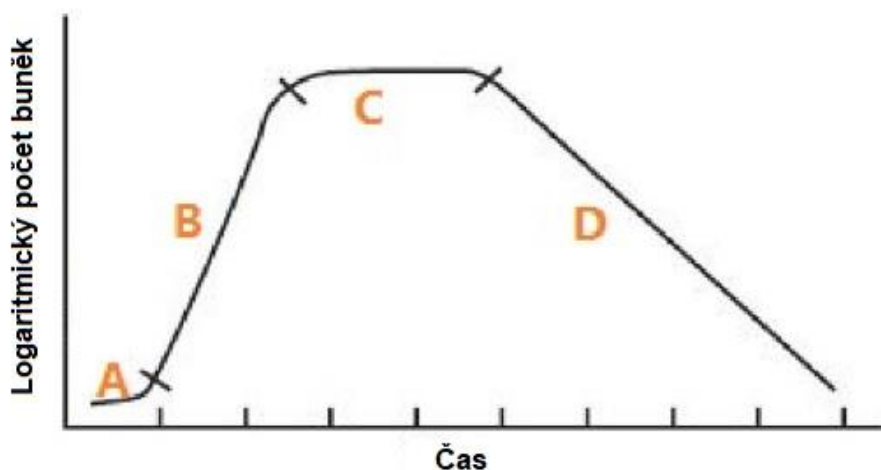
Zdrojem uhlíku může být i glycerol, ten také poskytuje vysoké výtěžky polysacharidu. Glycerol je vlivem bakterie *Komagataeibacter xylinus* oxidován na β -uhlíku a vznikne dihydroxyaceton, z kterého spojením dvou molekul vznikne monosacharid fruktóza [10].

V rámci současných trendů cirkulární ekonomiky se zkoumá využití odpadních zdrojů z potravinářského průmyslu pro produkci bakteriální celulózy. Tím se výrazně snižují výrobní náklady. Může se jednat o shnilé ovoce nebo odpady z výroby potravin a nápojů [11].

2.2.2 Produkce bakteriální celulózy

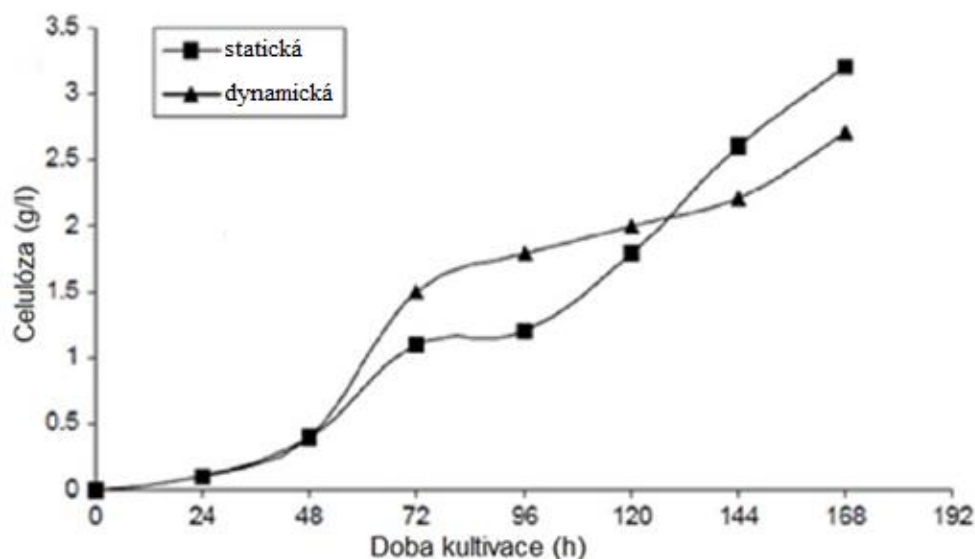
Pro vysoké výtěžky je podstatný výběr produktivní bakterie. Nejúčinnější bakterie se v tomto ohledu jeví *K. xylinus*, *K. hansenii*, *K. pasterianus*. Pro komerční výrobu je používán *K. xylinus* kvůli jeho vysoké produktivitě [4].

Zásadní vliv na kultivaci má složení média. Médium musí obsahovat živiny (zdroj uhlíku, dusíku, mikroelement atd.) a mít optimální pH. Různé typy sacharidů, používané jako zdroj uhlíku, vedou k rozdílným výtěžkům celulózy, přičemž nejvyšších výtěžků dosahují hexózy. Na produkci má také vliv objem média, objem inokula a plocha hladiny média, ve které kultivace probíhá. Optimalizace růstu je nezbytná pro zavedení výroby v průmyslovém měřítku [4].



Obrázek 6: Průběh kultivace bakteriální celulózy; A – Lag fáze, B – Exponenciální růst, C – Stacionární fáze, D – Fáze poklesu populace a smrti buněk [4]

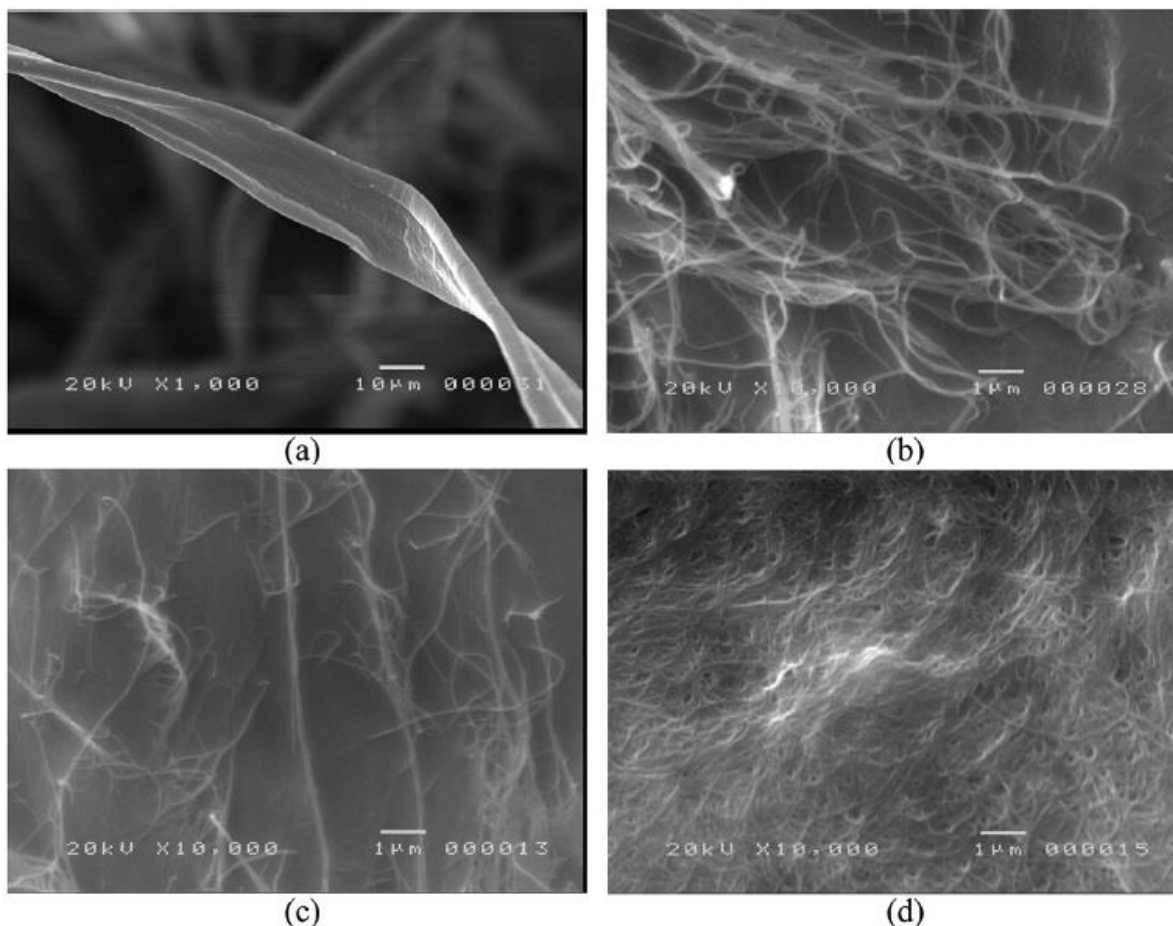
Obrázek 6 popisuje průběh růstu bakterií, kde v lag fázi dochází k adaptaci buněk na prostředí, následuje exponenciální růst, poté se nastává stacionární fáze, během níž je přírůstek nových buněk v rovnováze s úhynem, v závěrečné fázi dochází k exponenciálnímu úhynu buněk. Doba jednotlivých fází je závislá na druhu bakterií a na podmínkách. Výtěžnost BC stacionární a dynamické kultivace v čase je znázorněna na Obrázek 7 [4].



Obrázek 7: Časový průběh růstu koncentrace celulózy [4]

Proces produkce BC zahrnuje přípravu inokula, poté se inokulum naočkuje do předem připraveného média obsahující sacharid. Kultivaci trvající až tři týdny lze provést ve statickém nebo dynamickém režimu, případně v bioreaktoru. Vyprodukovaná celulóza se liší z pohledu makroskopické morfologie, mikrostruktury i vlastností. Principiálně existují tři základní druhy kultivace: 1. statická, 2. dynamická a 3. kultivace v bioreaktoru. Statická kultivace vede k akumulaci želatinové membrány celulózy na povrchu kultivačního média, zatímco dynamická kultivace vede k produkci kulovité, peletovité nebo nepravidelné hmoty [5]. Struktury rostlinné celulózy a bakteriální celulózy ve statické a dynamické kultivaci uvádí Obrázek 8. Výběr metody závisí na konečné aplikaci bakteriální celulózy, tj. na požadovaných fyzikálních, morfologických a mechanických vlastnostech [4,12].

Pohyb bakterií souvisí s produkcí BC. Tradiční kultivační metody nemohou přesně předpovědět pohyb bakteriálních kmenů, a proto bylo aplikováno několik metod při pokusech o manipulaci s pohybem bakterií během kultivace. Elektrické nebo elektromagnetické pole vyvolá usměrněný pohyb bakterií. A tak lze celou 3D strukturu BC regulovat řízením pohybu bakterií. BC tak lze připravit s orientovanou strukturou, strukturou tkání, více vláknovou vrstvou nebo gradientní strukturou pro konkrétní aplikace. Tato metoda má mnoho výhod, jako je jednoduchost, vysoká úroveň produkce a snadná realizace [4].



Obrázek 8: Mikrografie rostlinné celulózy (a) a bakteriální celulózy kultivované v bioreaktoru (b, c) a ve statickém režimu (d) [4]

2.2.2.1 Statická kultivace

Metoda statické kultivace je tradiční způsob k produkci BC a v laboratorním měřítku se tato metoda využívá nejčastěji, protože metoda je jednoduchá a produkuje celulózu požadovaných vlastností i v relativně vysokých výtěžcích [4].

Při statické kultivaci je inokulum a čerstvé médium naplněno do plochých nádob, inkubace probíhá po dobu 1–14 dnů při teplotě 20–30 °C a pH v rozmezí 4–7. Na rozhraní kultivačního média a vzduchu se vytváří bakteriální celulóza v podobě želatinové membrány. Vzniká biofilm a roste od okraje baňky směrem ke středu [4].

Fibrila ve tvaru pásu je méně než 100 nm široká a skládá se ze svazku mikrofibril o průměru cca 4 nm [3].

Produktem vyrobeným touto metodou je hydrogelová fólie s vynikajícími vlastnostmi a strukturou. Čerstvě sklizená celulóza je žlutá, která se čistí horkou vodou a roztokem hydroxidu sodného. Výsledný produkt je bezbarvý a čirý. Celulóza produkovaná statickým režimem kultivace je tvořena velmi hustou 3D sítí vláken s vysokou pórovitostí [13].

Avšak tento typ kultivace má zásadní nevýhody. Přívod kyslíku do média je omezený, to vede k pomalejšímu průběhu kultivace, a tím se zvyšují náklady. Proto tento režim kultivace není vhodný pro průmyslovou výrobu BC [14].

2.2.2.2 Dynamická kultivace

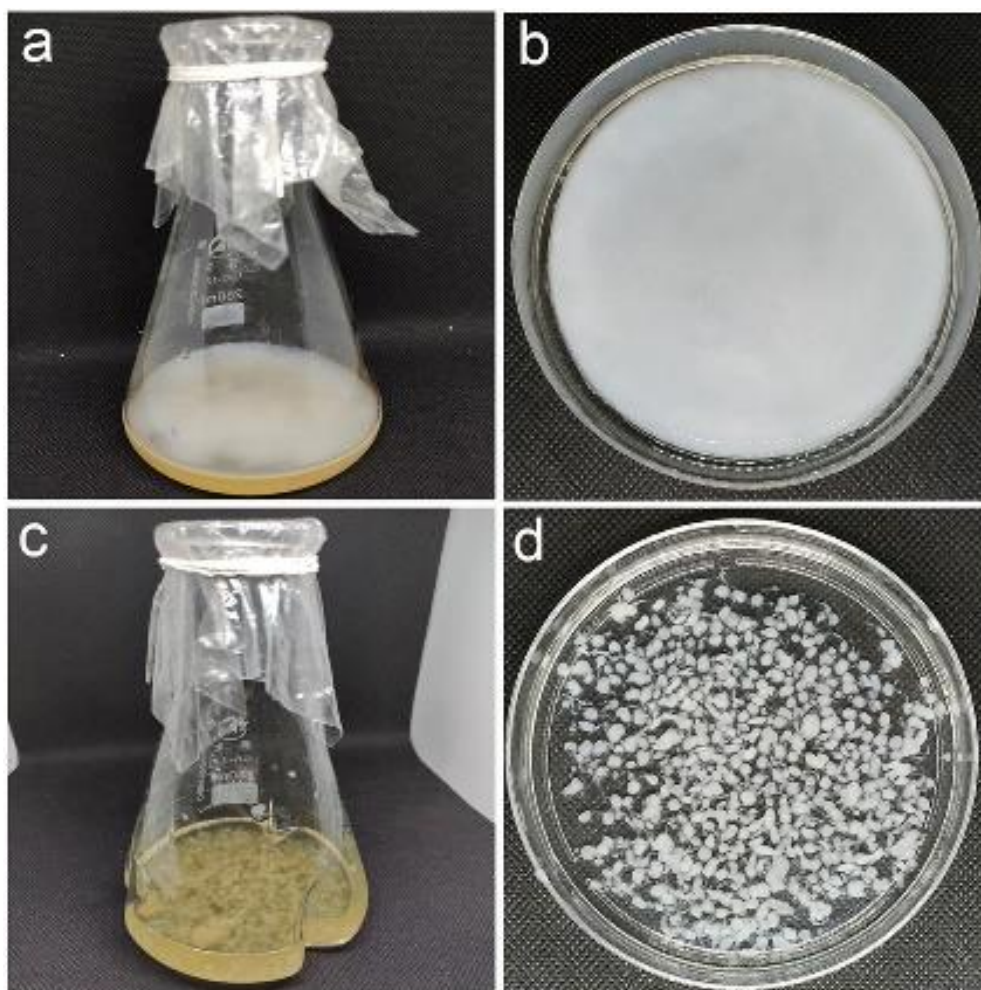
Zásadní vliv na produkci BC má přístup kyslíku do kultivačního média. Vyšší přísun vzduchu tedy vede k větším výtěžkům. Toho lze docílit mechanickým mícháním média nebo mícháním vzduchem. Vyšších výtěžků dosahuje míchání vzduchem. Přívod vzduchu do média zvýší produkci i rychlost kultivace. Avšak je tu i vyšší riziko kontaminace [4].

V laboratorních podmínkách je dynamická kultivace prováděna v Erlenmeyerových baňkách, přičemž míchání zajišťuje třepací inkubátor. V inkubátoru lze nastavit požadované parametry, jako jsou teplota a rychlost míchání [5].

Při agitovaném režimu dochází ke vzniku vláknité celulózy ve formě pelet. Tento způsob kultivace má však negativní vliv na mikrostrukturu a fyzikální vlastnosti. Takto produkovaná celulóza vykazuje nízkou molekulovou hmotnost, malou mechanickou pevnost, nízký index krystalinity a nízký stupeň polymerizace [5].

Dodávka kyslíku je přímo spojena s produkcí celulózy a je známa jako hlavní nevýhoda statické kultivace. Na druhou stranu bylo také prokázáno, že nadměrný přísun kyslíku vede k poklesu produkce [15].

Celulóza vyprodukovaná kultivací ve statickém a dynamickém režimu je pro srovnání uvedena na Obrázek 9 [9].



Obrázek 9: Srovnání struktur BC při statické (a, b) a dynamické (c, d) kultivaci [9]

2.2.2.3 Kultivace v bioreaktoru

Produkce bakteriální celulózy je nákladný a zdoluhavý proces, zejména v laboratorním měřítku při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách a míchání na třepačce. Použitím bioreaktoru lze výrobu zefektivnit; výrazně se zvýší výtěžek, zkrátí se doba produkce a značně klesnou výrobní náklady. Celulóza kultivovaná pomocí bioreaktoru je vláknitá a shlukuje se do pelet. Avšak takto získaná celulóza má své úskalí. Vláknitá BC má horší fyzikální, chemické i strukturální vlastnosti ve srovnání s pelikulární celulózou získanou statickou kultivací. Vzniklá vlákna jsou nepravidelná, celulóza se vyznačuje nízkou pevností, malou molekulovou hmotností, nízkým indexem krystality a stupněm polymerizace. Takovou celulózu nelze tedy využít pro všechny možné aplikace, zejména pro medicínské účely, kde jsou vyšší nároky na požadované vlastnosti [15].

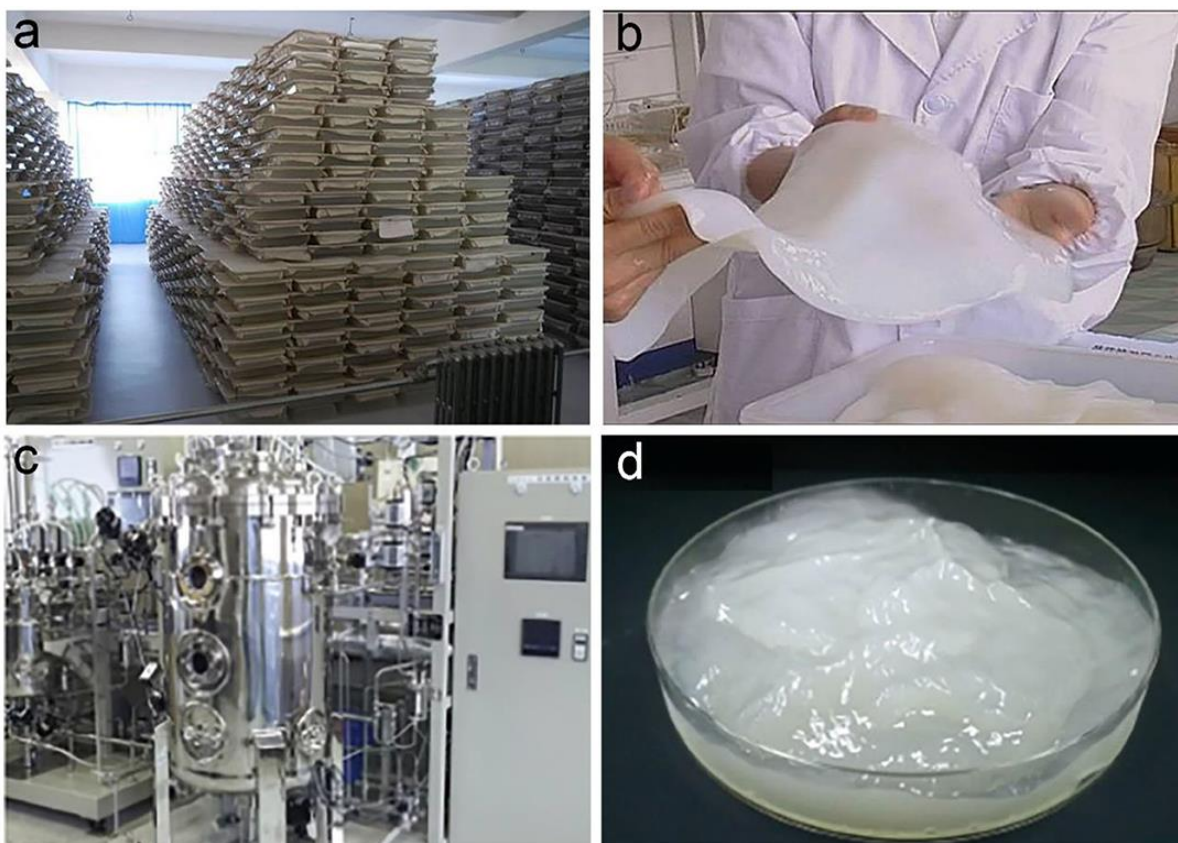
Při produkci BC je klíčovým faktorem přívod kyslíku do média. Použitím bioreaktoru při kultivaci je přísun kyslíku do média zajištěn, a to buď mechanickým mícháním použitím míchacího reaktoru, nebo mícháním pomocí vzduchu v Air-lift bioreaktoru. V míchacích reaktorech je distribuce kyslíku dostatečná, avšak za cenu vyšší spotřeby energie. Nicméně nadměrné míchání je nežádoucí, jelikož může zapříčinit vznik nepravidelných vláken celulózy a nárůst viskozity média, které je tvořeno rozptýlenou celulózou a buňkami bakterií. To by vedlo ke zvýšení potřebné energie a snížení prostupu kyslíku do média, a tím růst BC inhibován. Mechanickým mícháním se také poškozují buňky bakterií, ty poté neprodukují BC, pouze se množí [16,17].

Míchání vzduchem obohaceným o kyslík je při biosyntéze BC mnohem výhodnější, neboť se rychlost produkce i výtěžek značně zvýší. Bioreaktory jsou vybaveny sondami, tudíž dalšími výhodami, oproti kultivaci v Erlenmeyerových baňkách, je lepší monitoring a regulace teploty a pH média [15].

I přes svá úskalí je produkt vyrobený v bioreaktorech nejvhodnější metodou pro biosyntézu v průmyslovém měřítku. Ukázka průmyslové výroby je uvedena na Obrázek 10. V bioreaktorech vyrobená BC lze použít pro mnoho průmyslových aplikací, jako je vysoce kvalitní papír, obvazy na rány, dezertní jídla, kožní implantát aj. Porovnání kultivace v různých typech reaktorů je popsáno v Tabulka 2 [15].

Tabulka 2: Porovnání výhod a nevýhod různých typů reaktorů [18]

Typ reaktoru	Výhody	Nevýhody	Produktivita (g/l/h)	Produkce (g/l)
Míchaný reaktor	Vysoká koncentrace buněk a produktivita; dlouhodobá výroba	Smykové napětí buněk; větší mixovací výkon; spotřeba	0,058-0,23	4,57-13,0
Air-lift reaktor	Vysoká koncentrace buněk a produktivita; nízké smykové napětí	Vyšší spotřeba energie; dlouhá doba na vytvoření biofilmu	0,056-0,116	3,8-8,7
Reaktor s rotujícími disky	Vysoká koncentrace buněk; dobré pro aerobní kmeny; polokontinuální provoz	Vyšší riziko kontaminace	0,015	5,35



Obrázek 10: Průmyslová výroba BC prostřednictvím statické (a, b) a míchané fermentace (c, d) [9]

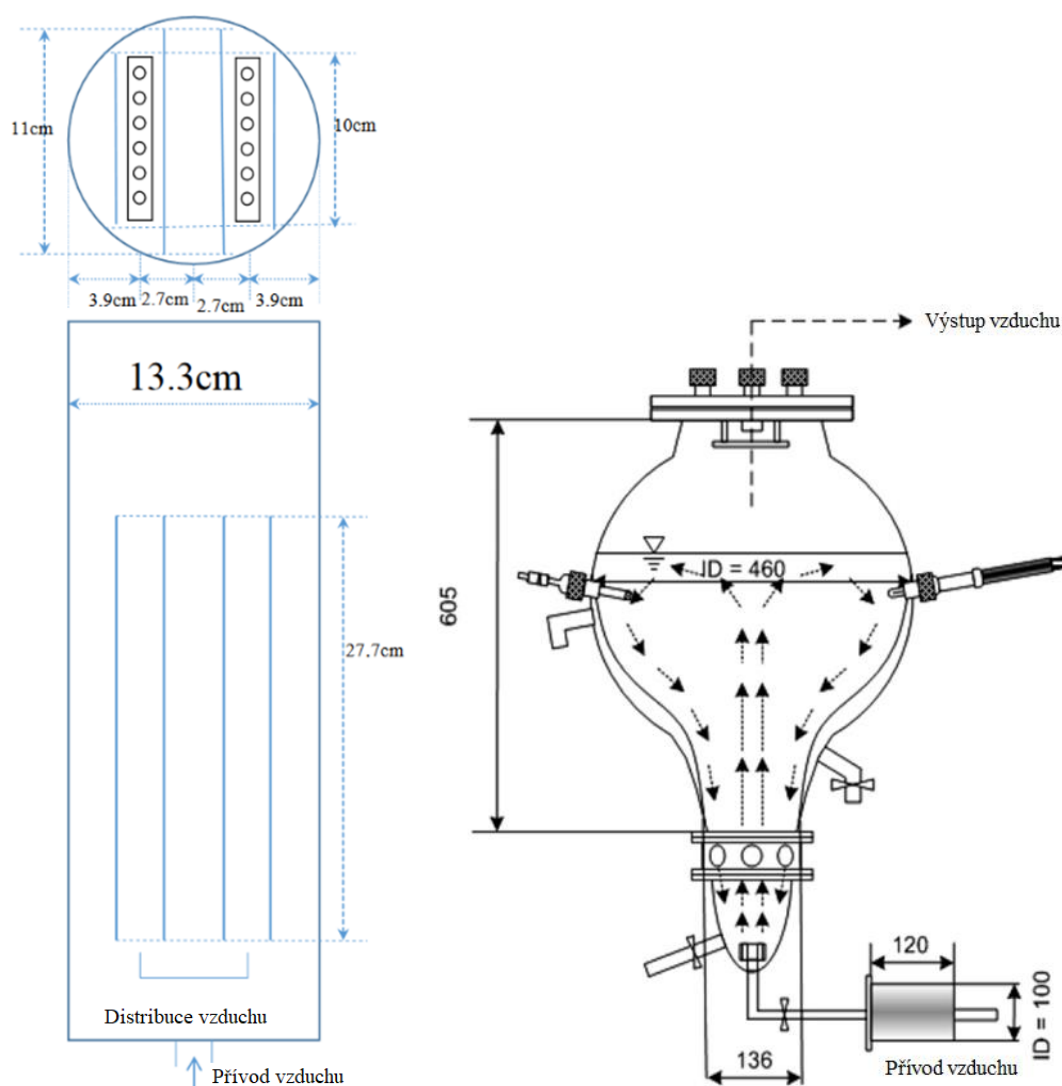
Kultivace v Air-lift reaktoru

Vzhledem k vysoké spotřebě energie a nežádoucímu vlivu na médium v míchaném reaktoru je vhodnější alternativou použití Air-lift bioreaktoru. Ten je energeticky úspornější a nevede ke zvyšování viskozity média. Také se při použití Air-lift bioreaktoru dosahuje vyšší produkce, a to až o 50 % ve srovnání s kultivací v třepacím inkubátoru [15].

Jedná se o věžový bioreaktor, do kterého je pomocí čerpadla vháněn vzduch, a tím dochází k míchání kultivačního média. Produkovaná BC je ve formě pelet eliptické morfologie [15].

Další výhodou Air-lift bioreaktoru, oproti míchanému reaktoru, je lepší regulace průtoku okysličeného vzduchu. A to nastavením výkonu čerpadla, ale i monitoringem pO_2 pomocí zabudované sondy. Schéma Air-Lift reaktoru je zobrazeno na Obrázek 11 [16].

Nedostatkem Air-lift bioreaktorů je omezené množství dodávaného kyslíku, proto bylo pro lepší výtěžky nutné bioreaktory modifikovat. Modifikovaný Air-Lift bioreaktor je v zásadě stejný jako běžný typ, ale je vybaven obdélníkovou drátěnou sací trubicí namísto jednoduché. Tím se zvýší přísun vzduchu a zmírňují se tak dopady omezené podávky kyslíku, jako je tomu u běžného typu [17].



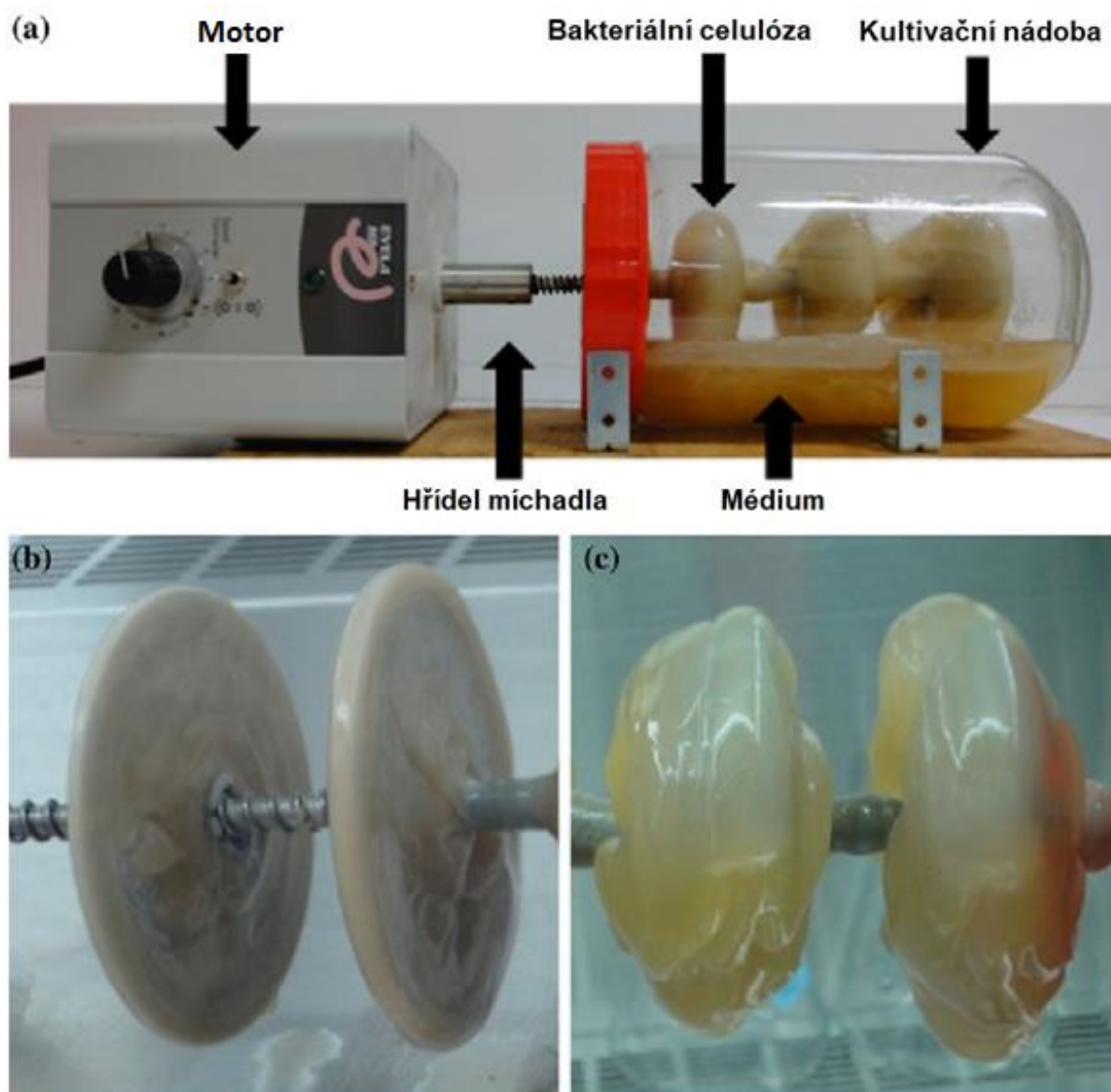
Obrázek 11: Schéma modifikovaného Air-lift bioreaktoru, převzato, upraveno [15]

Bioreaktor s rotačními disky

Pokročilejším typem je kultivace v bioreaktoru s rotujícími disky. Několik kruhových disků je upevněno na otočné centrální hřídeli se vstupem pro inokulum. Rotující disky jsou částečně ponořeny do média, přičemž jsou na jejich drsném povrchu přichytávány bakterie. Povrch disků střídavě interaguje s kultivačním médiem a se vzduchem. Tento typ bioreaktoru je schopen produkovat BC i po odběru celulózy, a to bez nutnosti opětovného naočkování média, díky přichyceným bakteriím na povrchu disků. Cyklus lze tímto způsobem opakovat až pětkrát. Příklad reaktoru s rotačními disky je zachycen na Obrázek 12 [4].

BC připravená pomocí rotačních disků je homogenní, avšak výtěžek není výrazně vyšší než při statické kultivaci. Nicméně tento způsob kultivace je náchylnější na kontaminaci [4].

Tento typ reaktoru je tedy schopen kultivovat polokontinuálně, a proto je využitelný pro komerční produkci bakteriální celulózy [4].



Obrázek 12: Bioreaktor s rotačními diskami (a). diskami (b), BC (c); převzato, upraveno [4]

2.2.3 Využití bakteriální celulózy

Bakteriální celulóza má široké využití v mnoha odvětvích, především v oblasti medicíny, ale také v potravinářském, papírenském a oděvním průmyslu [19].

MEDICÍNSKÉ APLIKACE

Pro své jedinečné vlastnosti má v medicíně BC široké uplatnění, zejména ve farmacii, chirurgii a tkáňovém inženýrství. BC má řadu benefitů, je to sterilní materiál, velmi flexibilní, je vysoce porézní a zadržuje značné množství vody, a to až stonásobek své váhy. Avšak největší předností je její biokompatibilita, nezpůsobuje tedy žádné toxické či alergické vedlejší účinky. Implantáty z BC jsou tedy organismem dobře přijímány a nevykazují známky zánětu. Každá aplikace má jiné požadavky na strukturní vlastnosti celulózy [20].

Obvazový materiál tvořený bakteriální celulózą s nižší pórovitostí se jeví jako vysoce kvalitní k ošetření povrchového zranění, a to zejména díky své schopnosti zadržovat vodu.

Je velmi vhodný pro hojení popálenin, chronických ran a otoků. Materiál je dostatečně porézní na to, aby byla zajištěna prodyšnost a nebyl tak ráně zamezen přístup vzduchu, zajišťuje hydrataci a poskytuje ochranu před infekcí. Má chladivý efekt, snižuje bolest a výborně přilne k pokožce. Rány ošetřeny tímto materiálem se hojí rychleji a sníží se tvorba jizev [13].

Celulózové pelikulum s vyšší porozitou se ukazuje jako vhodný materiál při dočasném nahrazování kůže. Taková celulóza zajišťuje lepší integraci buněk. Využití má i při regeneraci poškozených a nemocných orgánů, může sloužit i jako náhrada cév malého průměru [13].

Pacient využívající chladivých a hydratačních vlastností BC při léčbě popálenin je zachycen na Obrázek 13 [10].



Obrázek 13: Použití bakteriální celulózy k léčbě popálenin a ke kosmetickým účelům [10]

Díky své průhlednosti, prostupu světla, propustnosti pro kapaliny se ukazuje BC jako vhodný materiál pro výrobu kontaktních čoček. Vyrábí se nalitím viskózního roztoku BC do formy. Takové kontaktní čočky si zachovávají tvar až 8 týdnů [6].

Nanovlákná BC jsou strukturálně podobná se složkami extracelulární matrice, zejména s kolagenem. Celulóza i kolagen jsou často mechanickou podporou tkání. Oba materiály mohou být využity jako buněčné matrice. Avšak BC má vyšší biokompatibilitu, a má tedy výhodu oproti kolagenu v imunologické nereaktivitě. Proteiny, jako je kolagen, jsou náchylné ke spouštění imunitních reakcí, zatímco celulóza je polysacharid, a proto nevykazuje imunitní odpověď [21].

Může být použita jako skafold kostním tkáním, tedy jako náhražka odštěpené kosti. Takto použitá celulóza musí splňovat určité požadavky. Musí umožňovat migraci buněk a transport živin do buněk, což zajišťuje síť vzájemně propojených pórů. Vhodná velikost pórů se pohybuje v rozmezí 300 μm až 500 μm , přičemž každý tkáňový typ vyžaduje specifickou velikost pórů [22].

Ve farmacii ji lze použít jako lékový nosič. Medikament se pozvolna vstřebává přes pokožku, což umožňuje přesnější dávkování a přesnější zacílení na postižené místo. Nebo je využita výrobě tablet coby pojivo [21].

KOSMETIKA

Vlastnosti jako je výborná přilnavost k pokožce a zadržení vody využívá i kosmetický průmysl. Předností BC v kosmetologii je, že nevyvolává žádnou alergickou reakci. Celulóza je bez zápachu a je tedy vhodná využití jako obličejové masky. Pokožka je po aplikaci rozjasněná, hydratovaná a dojde ke snížení kožního mazu. Výsledný efekt používání masky z BC je zpevnění obličeje a mladistvější vzhled [23].

Pro dosažení lepších účinků BC pro kosmetické účely lze použít modifikaci kyselinou hyaluronovou nebo sericinem [23].

POTRAVINÁŘSTVÍ

V potravinářství je možno využít BC pro svou schopnost zadržovat vodu jako zahušťovadlo a stabilizátor, proto se hodí do potravin jako jsou jogurty, pudinky, želé, dresinky aj. Kalorická hodnota je velmi nízká, jelikož se jedná defacto o vlákninu, kterou člověk není schopen trávit [24].

Může být využita také pro výrobu vegetariánských náhražek masa. Nebo ji lze použít jako plnivo do zpracovaných masových produktů, kdy nasáknutá celulóza roztokem hovězího extraktu se přidává do hamburgerů nebo párků. Celulóza přidá masu na šťavnatosti a sníží kalorickou hodnotu až o 25 %. To vede ovšem ke snížení obsahu masa, a to pro mnohé spotřebitele není žádoucí [24].

Také má schopnost udržovat senzorické vlastnosti zpracovaných potravin po delší dobu. Jako stabilizátor teploty lze BC využít například u zmrzliny, kdy bylo zjištěno, že u takto adované zmrzliny docházelo k rozpouštění pomaleji a déle si zachovala svůj tvar [20].

V Asii se z celulózy připravené pomocí mikroorganismů připravují želé dezerty, zvané Nata de coco vyobrazený na Obrázek 14. Vyrábějí se z kokosového mléka či ananasové šťávy [20].

Bakterie *K. xylinus* je nejzastoupenější součástí mikrobiologického složení jablečného octa a nápoje kombucha, která je uvedena na Obrázek 15. Konzumace má vliv na hladinu krevního cukru a vede k redukci hmotnosti. Vzhledem k pozitivním účinkům těchto nápojů na lidský organismus se řadí *K. xylinus* k potenciálním probiotickým kulturám, a to zejména díky schopnosti zůstat naživu při průchodu zažívacím traktem, hlavně v žaludku, kde je nízká úroveň kyslíku a jsou přítomny kyseliny a žlučové soli [25].



Obrázek 14: Nata de Coco [24]



Obrázek 15: Kombucha s celulózou [24]

PAPÍRENSTVÍ

Také v papírenském průmyslu najde BC své uplatnění. Je kompatibilní s rostlinnou celulózou, papír lze použít jako podklad pro růst BC, ta následně slouží jako ochranná vrstva. Zvyšuje se tak životnost papíru, čehož lze využít při záchraně starých dokumentů. Výsledný „vylepšený“ papír je tak odolnější vůči absorpci vody, dosahuje vyššího lesku a hladšího povrchu bez negativního dopadu na fyzikální vlastnosti. Funguje jako zpomalovač hoření [21].

Jak vypadá papír vyrobený z BC uvádím na Obrázek 16.



Obrázek 16: Papír z bakteriální celulózy [21]

ODĚVNICTVÍ

Vlastnosti jako jsou snadná udržitelnost, tvarovatelnost a barvitelnost dělají z BC zajímavý materiál i pro oděvní průmysl. Je biodegradabilní a odpovídá i současným trendům s ohledem na životní prostředí. Takovou celulózu je ovšem modifikovat změkčovadlem. Vyrábí se z ní vyrábí celá řada oděvů či doplňků, jako jsou bundy, kabáty, trička, kabelky nebo boty [26].

Způsoby využití BC v oděvnictví jsou uvedeny na Obrázek 17.



Obrázek 17: Využití BC jako textilního materiálu [26]

DALŠÍ VYUŽITÍ

Obalový materiál

Dále může být BC využita jako obalový materiál. Je nutné ji ale modifikovat antibakteriálními složkami, složkami zachytávajícími kyslík a ethylen a absorbenty vlhkosti. Vzniká tak aktivní, hydrofobní a bakteriální obal na potraviny. Možné takové použití je vyobrazeno na Obrázek 18, kde si lze všimnout různých barevných modifikací [21].

Elektronika

BC se uplatňuje v elektronice jako elektrické vodiče, pro zlepšení vodivosti a odolnosti se modifikuje oxidem grafenu. Také se z ní vyrábí membrány pro reproduktory nebo sluchátka. Takto aplikovaná celulóza je přibližně stejně pevná jako hliník, ale zároveň dostatečně lehká, aby nedocházelo ke zkreslení zvuku. Sluchátko od firmy Aiaiai s membránou z bakteriální celulózy je na Obrázek 19 [27].

Filtrace

Díky své vysoké porozitě lze BC využít jako filtrační materiál. Modifikuje se polymery jako je polyethylenglykol a karboxymethylcelulóza. Takto modifikovaná BC se uplatňuje při úpravě vody jako absorbent, přičemž rozpuštěné látky ve vodě se absorbují [4].



Obrázek 18: Využití BC jako obalového materiálu [17] Obrázek 19: BC použitá jako membrána [27]

2.3 POTRAVINÁŘSKÝ ODPAD

Potravinovým odpadem se rozumí především odpady ze supermarketů, potravinářského průmyslu a odpady z domácností. Do potravinářského průmyslu patří mlékárenský, drůbežářský, cukrovarnický, masný průmysl, škrobárny, čokoládovny, pekárny, lihovary, pivovary, vinařské závody a jiné. Česká republika vyprodukovala v roce 2019 přes 37 milionů tun veškerých odpadů, tedy více než 3,5 tuny na každého obyvatele. A produkce odpadu každoročně stoupá [28].

Odpady z potravinářských výrob jsou zdrojem problémů se znečištěním životního prostředí. A to jak jejich skládkování, tak nevhodné spalování. Naopak vhodnějším způsobem nakládání s odpady je kompostování, nebo opětovné využití, a to jako krmivo, surovina pro další zpracování nebo jako zdroj energie [28].

Při zpracování ovoce a zeleniny vzniká velké množství vedlejších produktů a odpadů, jako jsou různé výlisky, slupky, dřeň, jádra, pecky a další. Např. jablečné výlisky z moštů lze použít k výrobě pektinu, nebo z jader pecek lze vylisovat oleje pro kosmetické účely. Z lignocelulózového odpadu ovoce a zeleniny lze izolovat různé sacharidy. Složky jako jsou celulóza, hemicelulóza a lignin jsou rozkládány buď tepelnou hydrolýzou v kyselém prostředí nebo enzymaticky na jednoduché sacharidy. Celulóza se štěpí na glukózu a hemicelulóza na pentózy (xylóza), které se nadále využívají v dalších biotechnologických procesech jako substrát. S ohledem na požadovaný produkt se využívá aerobní nebo anaerobní technologie za použití vhodného mikroorganismu. Konečnými produkty poté jsou bioethanol, kyselina mléčná, kyselina octová aj. Lignin pro svou vysokou výhřevnost je používán jako biopalivo, nebo k výrobě bioplastu [28].

Tímto typem odpadu obsahujících dostatek využitelných cukrů pro biotechnologické zpracování, jsou také slupky od banánu, u kterých se skýtá značný potenciál [3].

2.4 BANÁNY

Roční produkce banánů roste dramatickým tempem, v roce 2017 dosáhla 114 mil. tun, a to je o 3,2% více než v roce 2000, přičemž největšími producenty jsou Indie a Čína, ale pěstují se také v jiných zemích Asie, v Africe a Latinské Americe. Světová organizace pro výživu a zemědělství (FAO) uvádí, že v roce 2017 banánové plantáže rozprostíraly na přibližně 5,6 mil. ha půdy, přičemž v roce 1993 se jednalo jen o 3,6 mil. ha. Banány jsou významnou ekonomickou komoditou celosvětového významu [29].

Banány obsahují zejména vodu, ale představují také výživné ovoce bohaté hlavně na cukry, minerální látky, kde majoritní podíl zaujímá draslík, a vitamíny, přičemž s ohledem na doporučenou denní dávku jsou banány významným zdrojem vitamínu B6. Podrobnější složení banánů je rozepsáno v Tabulce 3 [30].

Tabulka 3: Nutriční složení banánů [30]

Složka	Obsah (g/100g)	Prvek	Obsah (mg/100g)	Vitamín	Obsah (mg/100g)
voda	75,1	K	400	vitamín A	0,021
cukry	20,9	Mg	34	vitamín B1	0,04
bílkoviny	1,2	P	28	vitamín B2	0,06
vláknina	1,1	Ca	6	vitamín B3	0,7
celkový dusík	0,19	Na	1	vitamín B6	0,29
tuky	0,1	Mn	0,4	vitamín B12	0
cholesterol	0	Fe	0,3	vitamín C	11
-	(KJ/100g)	Zn	0,2	vitamín D	0
energie	403	Cu	0,1	vitamín E	0,27

Pro své nutriční a charakteristické sensorické vlastnosti jsou tedy banány významnou složkou potravy lidské populace. Vysoká produkce a spotřeba banánu vede také ke značné produkci odpadu, až třetinu váhy tvoří slupka. [3]

Využití banánových slupek

Banánová slupka je organický odpad obsahující živiny, které lze ještě využít. Tento odpadový materiál tvoří třetinu hmotnosti banánu. Hlavní využitelnou složkou jsou sacharidy. Obsah monosacharidů ve slupce je vysoký, dosahuje až 18,5 %. Dále obsahuje vlákninu, lipidy, bílkoviny, vitamíny, stopové prvky s nejvíce zastoupeným draslíkem, antioxidační a enzymatické látky. Výživová hodnota banánové slupky závisí na fázi zralosti a kultivaru. Zráním slupky se obsah cukru a ligninu zvyšuje, zelené ho obsahují nejméně [3].

Banánové slupky lze využít jako levný zdroj uhlíku v rámci zisku produktů s přidanou hodnotou kvůli vysokému obsahu cukrů, lze je využít pro produkci BC, PHA apod. Celulózu lze snadno získat z banánové slupky relativně levným a ekologickým procesem pomocí fermentace *Komagataeibacter xylinus* [9].

Hlavní složku banánových slupek jsou sacharidy (59,1%) a hrubá vláknina (31,7%), přičemž se minoritně v banánové slupce vyskytují také bílkoviny (0,9 %), lipidy (1,7 %) a ostatní látky [3].

Surová banánová vláknina obsahuje cca. 60–65 % celulózy, 6–9 % hemicelulózy, 5–10 % ligninu, 3–5 % pektinu, 1–3 % popelu a extraktivní látky tvoří 3–6 % [3].

Banánové slupky se také používají k čištění vody, k výrobě etanolu, celulózy, jako hnojivo a při kompostování. [3]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MIKROORGANISMY

Použité chemikálie

Kvasničný extrakt, HiMedia Laboratories, Indie

Pepton bakteriální, HiMedia Laboratories, Indie

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

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

Kyselina citronová, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

Viscozyme, Sigma Aldrich, Německo

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

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

Folin-Ciocaltevovo činidlo, p.a., Penta, Česká republika

Uhličitan sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

Kyselina gallová, Sigma Aldrich, Německo

3,5-dinitrosalicylová kyselina, Sigma Aldrich, Německo

Vínan sodno-draselný, p.a., Lachema, Česká republika

Katechin, p.a., Sigma Aldrich, Německo

Chlorid hlinitý, bezvodý, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

Dusitan sodný, Penta, Česká republika

Použitý mikroorganismus

Komagataeibacter xylinum DSM 46604, Německá sbírka Liebnitz Institute DSMZ-German Collection

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

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

Jednopaprskový UV-VIS Spektrofotometr SPEKOL 1300 – Analytik Jena AG, Německo

Laboratorní váhy EK-300i – Helago, Česká republika

Laboratorní váhy Kern 440 – KERN, Německo

Laminární box Aura Mini – BioAir, Itálie

Lyofilizátor Freezone Freeze Dry Systém – Labconco Corporation, USA

Magnetická míchačka s ohřevem H370-HS-E – Benchmark Scientific, USA

Magnetická míchačka s ohřevem US 152 – Stuart Equipment, Velká Británie

pH metr pH Test 30 – Thermo Scientific, USA

Rastrovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 – PEI, Nizozemí

Temperovaná třepačka ES-20 – Biosan, Lotyšsko

Temperovaná třepačka UNIMAX 1010 – Heidolph Instruments, Německo

3.3 KULTIVACE A PRODUKCE BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY

Uchování kultury v kryozkumavkách

K dlouhodobému uchovávání bakteriálního kmene byly použity kryozkumavky. Do každé kryozkumavky bylo napipetováno 0,5 ml 30 % glycerolu, poté se provedla sterilizace. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl následně do kryozkumavek napipetován 1 ml bakteriální suspenze. Poté byly kryozkumavky uchovávány při teplotě -80 °C v mrazicím boxu.

Příprava inokula

Bylo připraveno kultivační médium se složením uvedeným v Tabulka 4 a 50 ml bylo převedeno do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Následně bylo kultivační médium sterilizováno. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo médium ve sterilním laminárním boxu zaočkováno z kryozkumavky. Kultivace probíhala na třepačce při teplotě 30 °C a 150 rpm po dobu jednoho týdne.

Tabulka 4: Složení pevného média pro inokulum

Chemikálie	Hmotnost (g)
Glukóza	100
Uhličitan vápenatý	20
Kvasničný extrakt	10
Agar	17
Destilovaná voda	1000

Kultivace

Nejprve bylo připraveno kultivační médium, jehož složení uvádí Tabulka 5. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 5,2 pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové.

Tabulka 5: Složení produkčního média

Chemikálie	Hmotnost (g)
Glukóza	20
Pepton	5
Kvasničný extrakt	5
Kyselina citronová	1,15
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	6,8
Destilovaná voda	1000

Pro statickou kultivaci byly použity 250 ml Erlenmeyerovy banky. Do každé bylo přivedeno kultivační médium o objemu 100 ml a následně vysterilizováno. Po vychladnutí bylo do každé baňky ke sterilnímu médiu napipetováno 10 ml inokula ve sterilním laminárním boxu.

Kultivace následně probíhala staticky nebo dynamicky na inkubované třepačce při teplotě 30°C po dobu 14 dnů. Dynamická kultivace probíhala při 150 rpm.

V případě využití hydrolyzátu z banánových slupek byl hydrolyzát použit jako náhrada zdroje uhlíku a kvůli jeho kapalné formě i jako náhrada destilované vody.

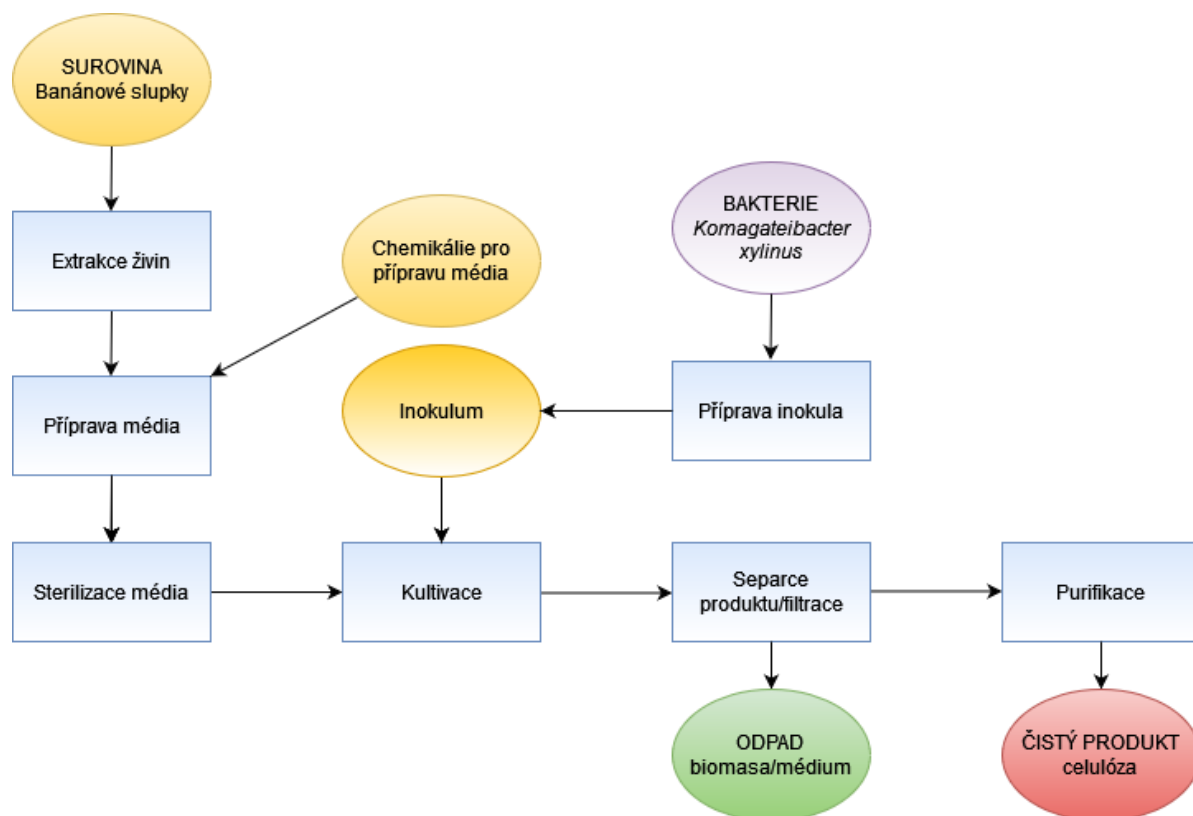
Pokud byla prováděna kultivace se sférickou zábranou bylo médium připraveno dle Tabulka 5. Jediným rozdílem bylo potom přidání voskových pelet pro vytvoření sférické zábrany.

Čištění bakteriální celulózy a uchování vzorků

Čištění bakteriální celulózy probíhalo ve třech krocích. Prvně byla BC ponořena na 15 minut do ethanolu, poté se promývala 15 minut v horké vodě. Následně byla vyčištěna v horkém roztoku 0,1M NaOH po dobu 20 minut, dokud nedošlo k odstranění zbytků bakterií a média. Nakonec byla promyta horkou vodou, aby se dosáhlo neutrálního pH. Kontrola byla provedena pH papírky. Celulóza byla umístěna do zkumavek a byla uchovávána v chladícím boxu. Poté byla pomocí lyofilizátoru vysušena.

Metodika použitá pro přípravu hydrolyzátu z banánových slupek

Vysušené banánové slupky se nejprve nejemno pomlely. 100 g mletých slupek bylo macerováno po dobu 4 hodin v 1000 ml vody. Po čtyřech hodinách bylo pH upraveno na hodnotu 4,5-5 pomocí 1M kyseliny sírové. Následně byl na 100 g slupek přidán 1% roztok Viscozymu L. Poté se vzniklá suspenze ponechala 24 hodin na třepačce při 37 °C, 150 rpm. Na závěr se vzniklý hydrolyzát zfiltraval.

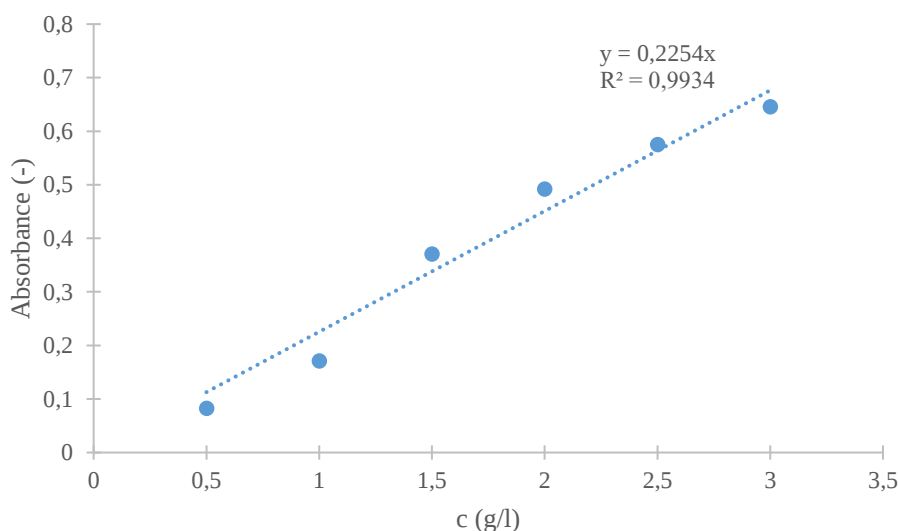


Obrázek 20: Schéma návaznosti prací

3.4 ANALYTICKÉ METODY

Spektrofotometrické stanovení cukrů pomocí metody DNS

Pro přípravu činidla DNS je nutné rozpustit 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové ve 100 ml destilované vody a 40 ml 2M NaOH. V tomto roztoku bylo rozpuštěno 60 g vínanu sodno-draselného. Vzniklý roztok byl doplněn vodou tak, aby celkový objem činil 200 ml. Při analýze je ve zkumavce vždy smícháno 0,5 ml DNS činidla a 0,5 ml roztoku obsahující redukující sacharidy. Poté je vzorek 10 minut inkubován ve vodní lázni o teplotě 70 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu je do zkumavky napipetováno 10 ml destilované vody a vzorek je proměřen na spektrofotometru při 540 nm proti slepému vzorku. Pro získání kalibrační křivky je nutné 0,5 ml DNS činidla smísit vždy s 0,5 ml roztokem glukózy o koncentraci 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 a 3,0 g/l. Pracovní postup je nadále shodný s pracovním postupem analýzy vzorku.

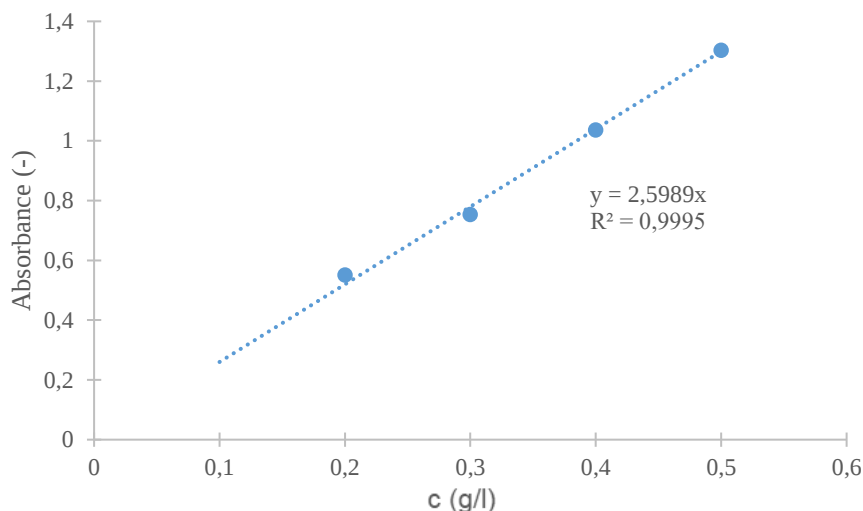


Obrázek 21: Kalibrační přímka pro redukující cukry

Stanovení polyfenolů

Po naředění Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9 (v/v) s vodou je 1 ml tohoto roztoku napipetován do zkumavky k 1 ml destilované vody a 50 μ l vhodně naředěného vzorku. Po pěti minutách je napipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po 15 minutách je vzorek změřen při 750 nm proti slepému vzorku.

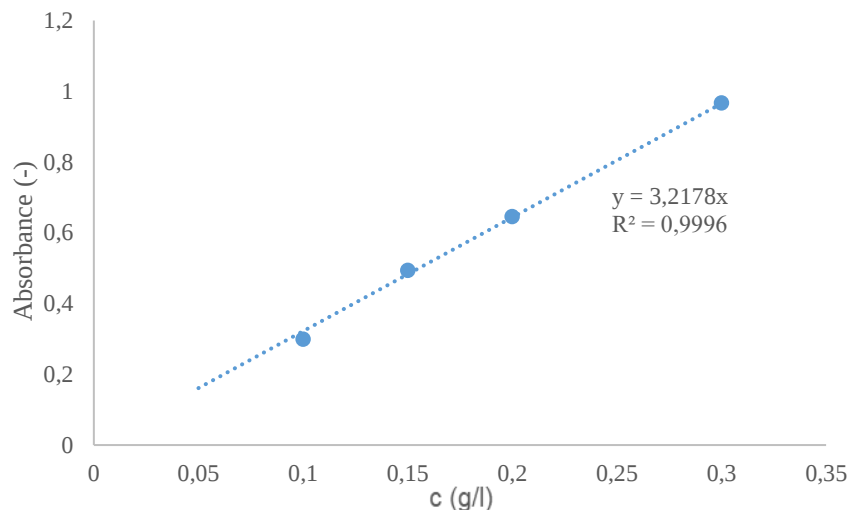
Pro kalibrační křivku je jako standard využit roztok kyseliny gallové o koncentraci 0,2—0,5 mg/ml.



Obrázek 22: Kalibrační přímka pro polyfenoly

Stanovení flavonoidů

Do zkumavky je k 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO_2 napipetováno 0,5 ml vhodně naředěného vzorku. Po pěti minutách se do zkumavky přidá 0,2 ml 10% AlCl_3 a po dalších pěti minutách 1,5 ml 1M NaOH a 1 ml destilované vody. Patnáct minut se směs nechá stát a poté je proměřena na spektrofotometru při 510 nm proti destilované vodě. Pro kalibrační křivku je jako standard využit roztok katechinu o koncentraci 0,1—0,3 mg/ml.



Obrázek 23: Kalibrační přímka pro flavonoidy

Rastrovací elektronová mikroskopie

SEM byla využita k zobrazení struktury připravených hydrogelů. Vzorky byly před analýzou lyofilizovány a následně poprášeny zlatem. Samotné měření probíhalo při urychlovacím napětí 3 kV a ve vzdálenosti 3,78-5,54 mm. Vzorky byly proměřeny v různých přiblíženích na průřezu a na povrchu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 ANALÝZA HYDROLYZÁTU Z BANÁNOVÝCH SLUPEK

Hydrolyzát z banánových slupek byl podroben analýze pomocí techniky HPLC a spektrofotometrickému stanovení na cukry, polyfenoly a flavonoidy.

4.1.1 Stanovení cukru

Hydrolyzát vyrobený ze 100 g vysušených a rozemletých slupek od banánů byl podroben enzymatické hydrolýze a následné analýze pomocí metody HPLC, kde byla identifikována směs redukujících cukrů o celkové koncentraci 19,44g/l, přičemž nejvíce zastoupenými byly fruktóza (10,46g/l) a glukóza (8,86g/l), minoritně xylóza (0,11g/l). Dle literatury by ve vzorku měly být přítomny i arabinóza, manóza, sacharóza, rhamnóza a galaktóza, ty se však nepodařilo ve vzorku identifikovat [31]. Současně byla vyloučena jejich přítomnost. Při spektrofotometrickém stanovení pomocí metody DNS byl obsah redukujících cukrů vyhodnocen na 21,18g/l.

Tabulka 6: HPLC analýza cukrů v hydrolyzátu z banánových slupek

vzorek	glukóza [g/l]	fruktóza [g/l]	xylóza [g/l]	suma [g/l]
banánový extrakt	8,86	10,46	0,11	19,44

Tabulka 7: Naměřené absorbance pro 100x zředěný hydrolyzát z banánových slupek a vypočtené koncentrace cukrů

Měření	A	c (g/l)
1.	0,048	21,2955
2.	0,048	21,2955
3.	0,049	21,7391
4.	0,046	20,4082
Průměr	0,04775	21,1846

Pro metodu DNS byly vytvořeny kalibrační křivky pro redukující cukry, přičemž pro kalibraci byla použita D-glukóza, podle kterých je stanovena koncentrace cukrů z absorbance vzorku. Spektrofotometrické stanovení redukujících cukrů je jednodušší metoda a méně časově náročná ve srovnání s metodou HPLC, avšak HPLC poskytuje mnohem přesnější výsledky. Metoda DNS obsah cukru nadhodnocuje, výsledek tohoto stanovení je 1,09krát vyšší oproti metodě HPLC.

Banánové slupky o hmotnosti 100g, ze kterých byl připraven hydrolyzát, dle stanovení HPLC, obsahují 19,44g cukru. Literatura uvádí obsah cukrů ve slupkách 1,76 – 4,09% v závislosti na stáří slupek. Avšak obsah cukrů se v závislosti na čase a fázi rozkladu zvyšuje, může dosáhnout až 18,5 g/100g sušiny [32].

Vyšší obsah je způsoben tím, že celulóza obsažená v banánových slupkách byla podrobena enzymatické hydrolýze za vzniku glukózy, a tím ke zvýšení obsahu redukujícího cukru.

4.1.2 Stanovení polyfenolů a flavonoidů

Pro stanovení polyfenolů byla kalibrace provedena na kyselinu gallovou, z absorbancí vzorku pomocí spektrofotometrie byl stanoven obsah polyfenolů v hydrolyzátu na 230,9 mg/100g sušiny. Pomocí katechinu byla sestrojena kalibrační křivka pro flavonoidy, z níž byla stanovena koncentrace flavonoidů na 128,2 mg/100g sušiny. Literatura uvádí v čerstvých banánových slupkách obsah polyfenolů v rozmezí 1567,84 mg/100g sušiny a obsah flavonoidů 1100 mg/100g sušiny. Avšak koncentrace v závislosti na čase rychle klesá. Nižší obsah polyfenolů a flavonoidů v hydrolyzátu byl způsoben stářím slupek [32].

Tabulka 8: Naměřené absorbance pro 10x zředěný macerát banánových slupek a vypočtené koncentrace polyfenolů

Měření	A	c (g/l)
1.	0,056	0,2155
2.	0,064	0,2463
3.	0,060	0,2309
Průměr	0,060	0,2309

Tabulka 9: Naměřené absorbance pro nezředěný macerát z banánových slupek a vypočtené koncentrace flavonoidů

Měření	A	c (g/l)
1.	0,411	0,1277
2.	0,412	0,1280
3.	0,412	0,1280
4.	0,415	0,1290
Průměr	0,4125	0,1282

4.2 PRODUKCE BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY

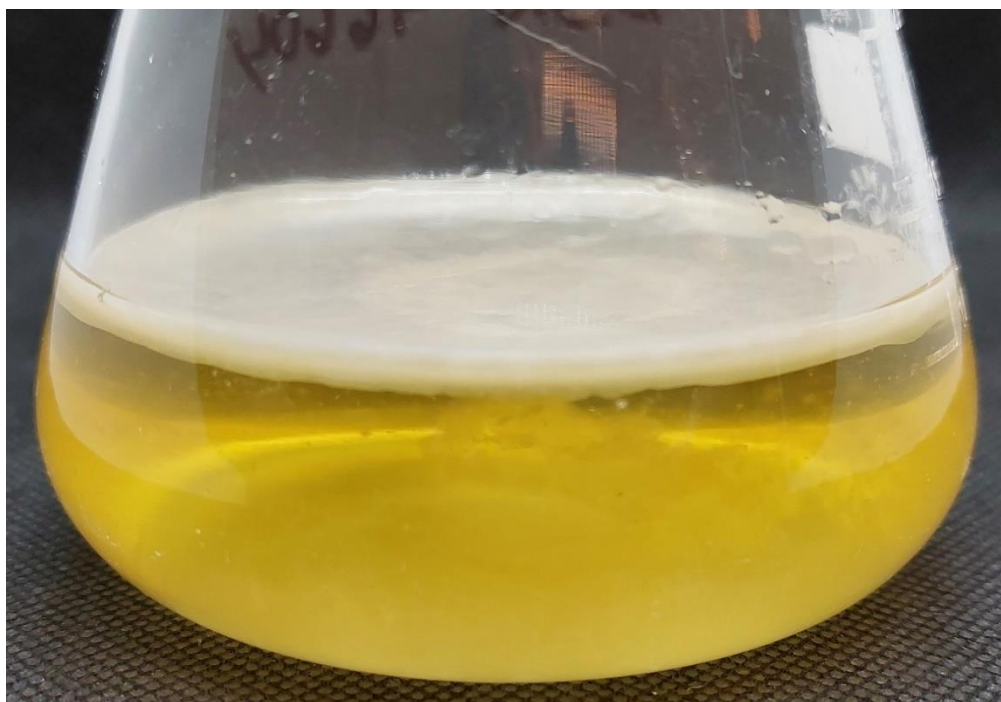
Na kultivaci bakteriální celulózy bylo použito kultivační médium, kde jako zdroj uhlíku byla použita D-glukóza, nebo hydrolyzát z banánových slupek. Kultivace probíhala ve statickém i dynamickém režimu. Dynamická kultivace byla také experimentálně modifikována přidáním voskových sférických zábran. Všechny kultivace probíhaly za stejných podmínek. při teplotě 30 °C po dobu 14 dnů. Průběh kultivace se statickým režimem je zachycen na Obrázek 24 a Obrázek 25, výtěžky celulózy pro jednotlivé kultivace jsou uvedeny v Tabulka 10.

Tabulka 10: Průměrné výtěžky celulózy ve statickém a dynamickém režimu za použití glukózy a hydrolyzátu ze slupek

Typ kultivace	Zdroj uhlíku	Hmotnost BC (mg)	Výtěžek (mg/l)	Odchylka
Statická	glukóza	36,3	363,1	81,8
	banánový hydrolyzát	97,8	977,8	506,4
Dynamická	glukóza	3,1	30,7	15,5
	banánový hydrolyzát	9,8	98,5	58,7
Dynamická se sférickou zábranou	glukóza	6,7	335,0	36,1
	banánový hydrolyzát	11,4	568,3	103,7



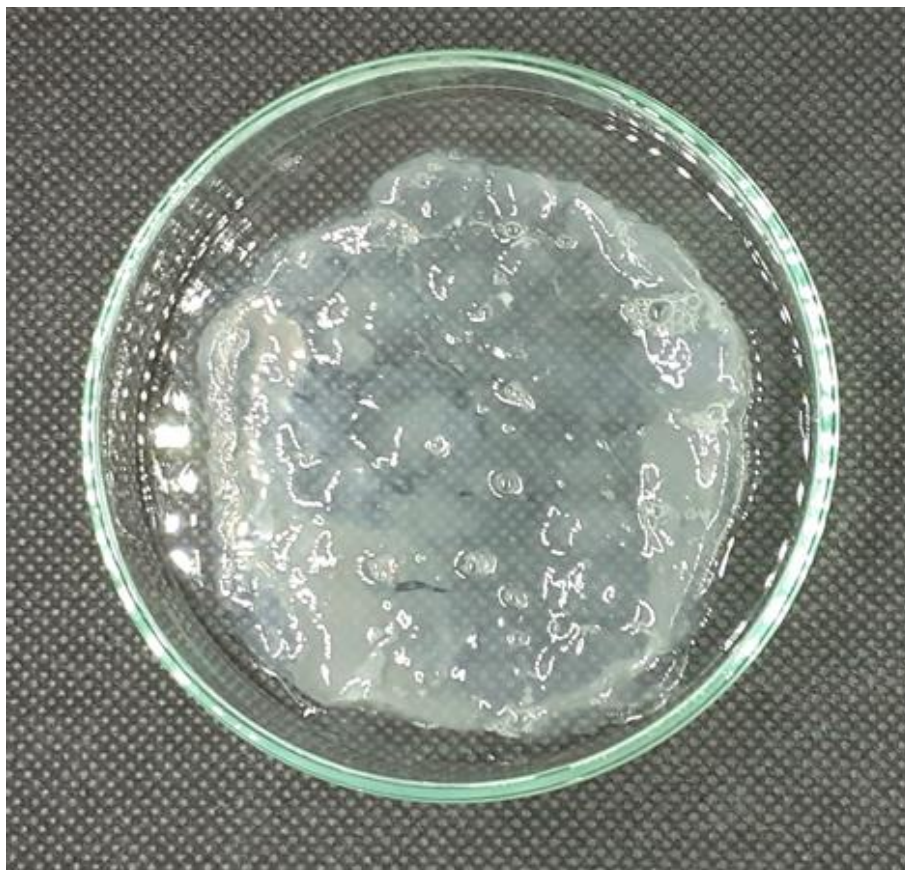
Obrázek 24: Průběh statické na inkubované třepačce s médiem obsahující glukózu (světle zbarvené) a médiem z banánových slupek (tmavě zbarvené)



Obrázek 25: Kultivace BC na médiu obsahující glukózu s narostlou celulózu

Vliv typu kultivace na produkci BC

Ve statickém režimu bylo dosaženo mnohem vyšších výtěžků oproti dynamické kultivaci, a to řádově až o desetinásobek. Také byly patrné rozdíly ve struktuře celulózy, statická kultivace produkovala pevnou, hustou a soudržnou celulózu, kdežto kultivace v dynamickém režimu tvořila jemná vlákna shluklé do chomáčků. Z dat tedy vyplývá, že pro kultivaci bakteriální celulózy je vhodnější volit statický režim před dynamickou kultivací. Ukázka vyčištěné celulózy kultivované ve statickém režimu, která ještě nebyla vysušena, je na Obrázek 26.



Obrázek 26: Bakteriální celulóza kultivovaná ve statickém režimu

Ale výtěžky se různí i v rámci jednoho kultivačního režimu, čemuž tak je v důsledku nepředvídatelného chování bakterie. Průměrný výtěžek při použití glukózy jako substrátu ve 100 ml média činil při statické kultivaci 36,1 mg, nicméně v některých případech celulóza dorůstala do hmotnosti až 52,8 mg. Avšak výtěžek z dynamické kultivace při stejném kultivačním objemu nepřevyšoval hmotnost 4,5 mg.

Je to způsobeno tím, že celulózová vlákna se při statické kultivaci seskupují do struktur, zpravidla do jednoho souvislého plátu na hladině kultivačního média.

U dynamické kultivace jsou celulózová vlákna tvořena po celém objemu média, jsou převážně rozptýlená a shlukují se jen omezeně. Výtěžky dynamického režimu jsou tedy významně nižší z důvodu, že značná část celulózy zůstává ve filtrátu.

Vliv hydrolyzátu z banánových slupek na produkci BC

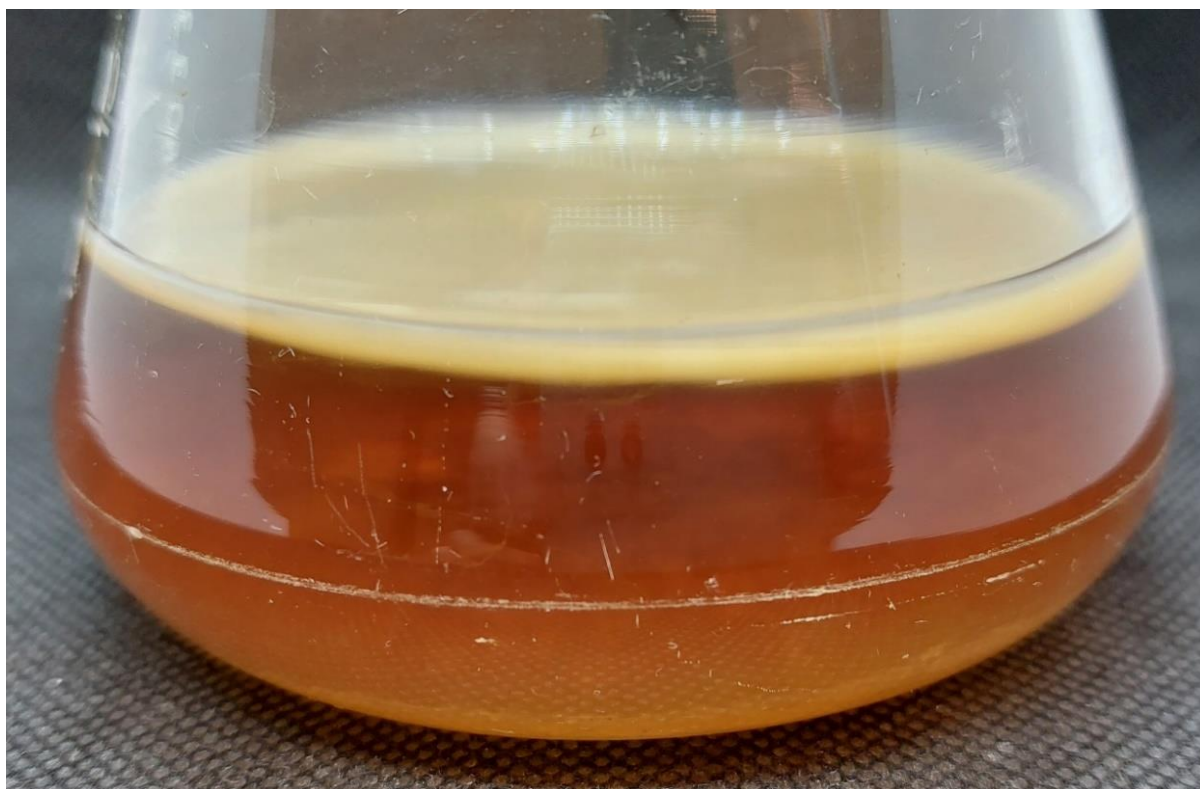
Výrazný rozdíl ve výtěžku byl pozorován při srovnání kultivace, kde byl zdroj uhlíku použita glukóza, a kultivace, kde byl použit hydrolyzát z banánových slupek jako médium.

Zvýšená produkce celulózy při použití hydrolyzátu z banánových slupek byla patrná již během kultivace. Výsledným produktem ve statickém režimu byla silnější a hustější celulóza, která byla vyprodukována v průměru ve 3krát větším množství než při kultivaci na glukóze. Avšak výtěžky při statické kultivaci za použití hydrolyzátu se značně lišily, v některých případech až o trojnásobek. To deklaruje nepředvídatelné chování bakterií.

V dynamickém režimu bylo vyprodukováno za použití hydrolyzátu 10krát méně celulózy oproti statickému režimu, avšak 3krát více ve srovnání s dynamickou kultivací za použití glukózy.

BC byla zbarvena do hněda vlivem kultivačního hydrolyzátu, které obsahovalo polyfenoly a flavonoidy. Celulóza se hůře čistila, i v konečném produktu bylo znatelné zbarvení signalizující přítomnost zbytkových barvicích látek pocházejících z banánových slupek.

Zabarvení média včetně na hladině vyprodukované celulózy je k vidění na Obrázek 27.



Obrázek 27: Kultivační médium z banánových slupek s vyprodukovanou celulózou

Vliv sférických zábran při dynamické kultivaci

Za účelem zvýšení výtěžku byla experimentálně provedena kultivace se sférickou zábranou v dynamickém režimu. Jedná se kousky syntetického vosku o průměru 5 mm, které jsou vpraveny do kultivačního média se zaočkovanou kulturou. Kultivace s voskovými sférickými zábranami včetně vyprodukované celulózy je vyobrazena na Obrázek 28.



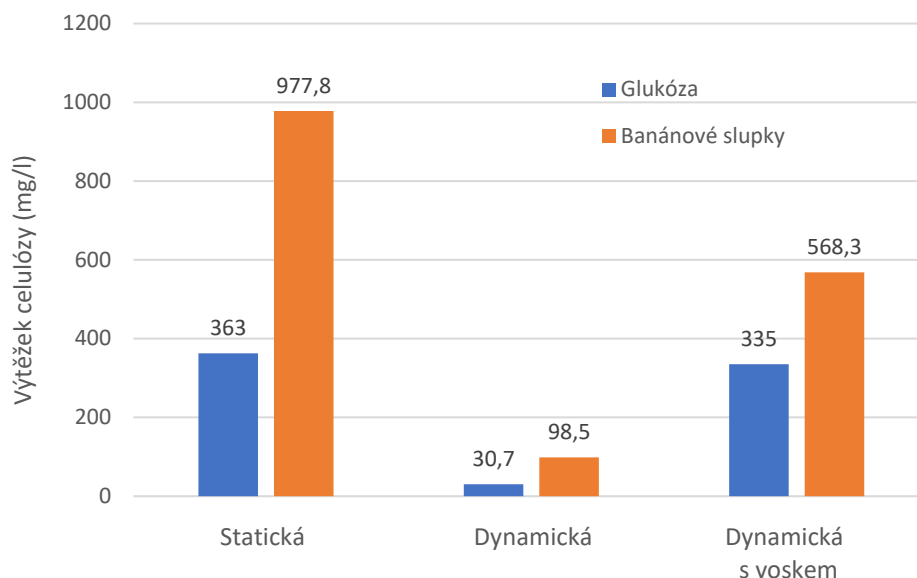
Obrázek 28: Dynamická kultivace za přítomnosti voskových sférických zábran s vyprodukovanou celulózou, která byla kultivována v médiu z glukózy (vlevo) a v macerátu ze slupek (vpravo).

Experiment dokázal, že kultivace bakteriální celulózy v dynamickém režimu za přítomnosti voskových kousků s funkcí sférické zábrany vykazuje vyšší výtěžek ve srovnání s dynamickou kultivací prostou, a to asi 10x více na glukóze a 6x na hydrolyzátu. Také měla soudržnější strukturu, vlákna byla do sebe mnohem více propletená, výsledná celulóza měla houbovitý charakter. Během kultivace se celulóza tvořila v celém objemu média a obrůstala voskové kousky.

Kultivace za použití glukózy produkovala téměř srovnatelně ve statickém režimu a v dynamickém režimu za použití sférických zábran. Ovšem kultivace za použití banánových slupek v dynamickém režimu za použití sférických zábran vyprodukovala o 42% méně celulózy oproti statickému režimu, nicméně výtěžek je téměř dvojnásobný oproti dynamické kultivaci na glukóze za použití sférických zábran.

Srovnání kultivací

Při porovnání výtěžků různých kultivací jasně vyplývá, že nejvýnosnějším způsobem je statická kultivace, přičemž substrátem je hydrolyzát z banánových slupek. Hydrolyzát ze slupek vykazoval vyšší výnosy BC ve všech kultivacích, je srovnání s glukózovým médiem. Také byla patrná vyšší kvalita celulózy. Vzhledem k dostupnosti a nízkým pořizovacím nákladům, představují banánové slupky velmi vhodný substrát pro kultivaci a nic nebrání širšímu využívání k tomuto účelu.



Obrázek 29: Výtěžnost bakteriální celulózy z kultivace statické, dynamické a dynamické s použitím voskových zábran

Na Obrázek 29 jsou patrné rozdíly ve výtěžcích při kultivaci na glukózovém médiu a kultivaci na banánovém hydrolyzátu, také při srovnání statického a dynamického režimu, včetně demonstrace přínosu sférických zábran při dynamické kultivaci. Zajímavé je, že hydrolyzát poskytuje vyšší výtěžky celulózy i při dynamické kultivaci s voskovými zábranami než statická kultivace na glukóze.

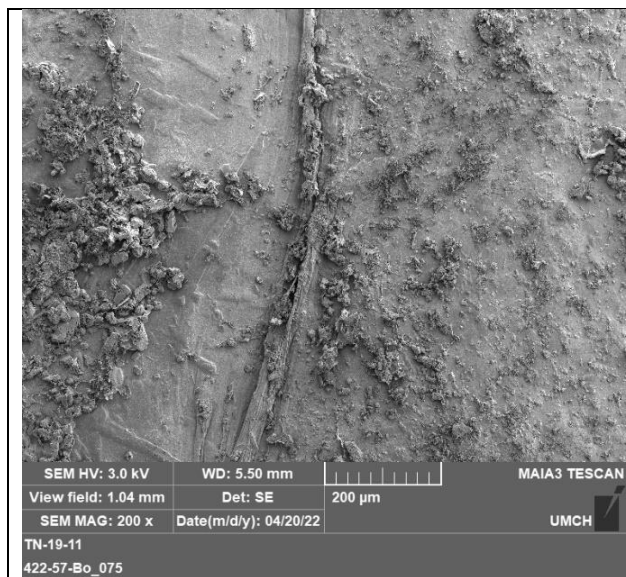
4.3 MORFOLOGIE VZORKŮ BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY

Pomocí analýzy SEM byly vzorky porovnávány s ohledem na rozdíl mezi typem produkce – statická a dynamická. Struktura vzorků byla také srovnávána s ohledem na použitý uhlíkový zdroj.

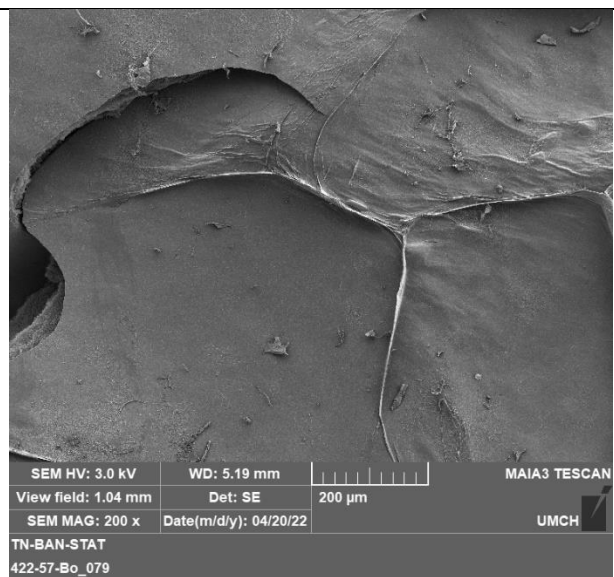
Byl potvrzen rozdíl mezi statickou a dynamickou produkcí, kdy u statické produkce je viditelná síť vláken, zatímco u kultivace dynamické jsou viditelné póry.

U statické kultivace na glukózovém médiu vypadá povrch celulózy soudržně, celistvě, s hladkým povrchem. Situace u BC z banánových slupek je obdobná, ovšem povrch se jeví drsnější. Dynamická kultivace produkuje BC s pravidelnými póry, u produkce na banánových slupkách došlo ke ztrátě pravidelnosti pórů.

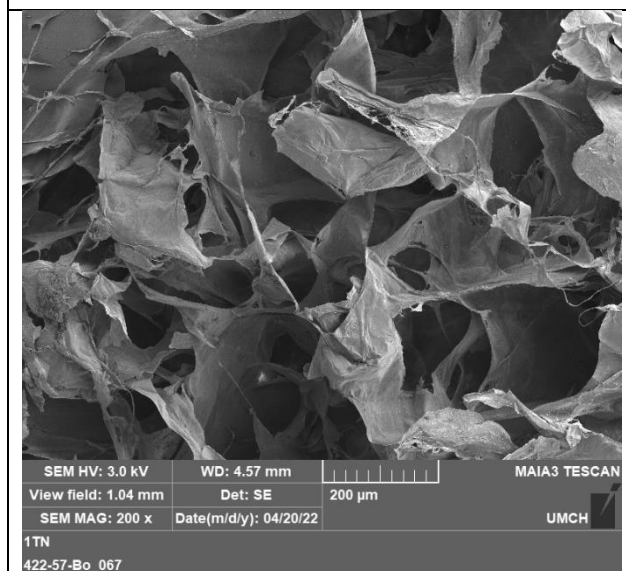
Struktury BC jednotlivých kultivací jsou pomocí elektronové mikroskopie vyobrazeny na Obrázek 30-33.



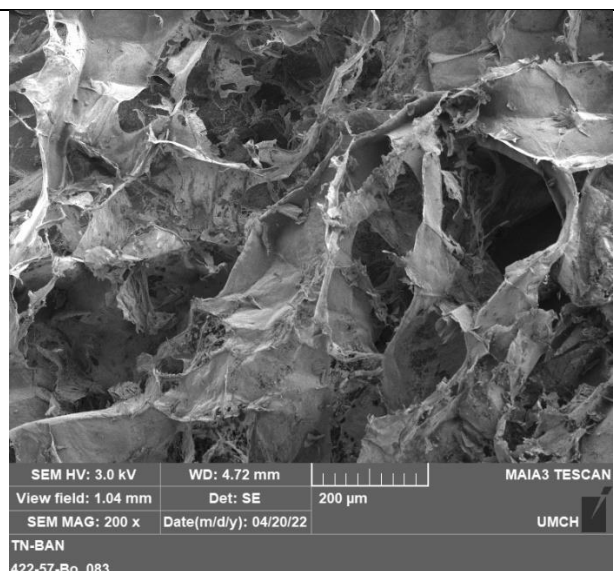
Obrázek 30: BC statická kultivace na glukóze



Obrázek 31: BC statická kultivace na hydrolyzátu



Obrázek 32: BC dynamická kultivace na glukóze



Obrázek 33: BC dynamická kultivace na hydrolyzátu

5 ZÁVĚR

Bakteriální celulóza má pro své jedinečné vlastnosti potenciál širokého využití, své uplatnění nachází v mnoha odvětvích, zejména v medicíně. Je tedy nutné optimalizovat produkci a nalézt levné a účinné suroviny pro její výrobu. Vhodný kandidát na takovou surovinu může pocházet z potravinářského odpadu, jako jsou banánové slupky. Banánové slupky obsahují značné množství různých sacharidů a dalších látek podporujících růst celulózy, které jsou pro kultivaci vhodné. Vzhledem tomu, že jedná defacto o odpad, má tedy tento typ substrátu nízké pořizovací náklady, rozhodli jsme se experimentálně kultivovat bakteriální celulózu pomocí hydrolyzátu připraveného z banánových slupek.

Z banánových slupek, které by za běžných okolností skončily v odpadkovém koši, byl připraven hydrolyzát, který obsahoval značné množství živin. Pro kultivaci BC však bylo potřeba získat jednoduché cukry, které bakterie zvládne využít. Toho bylo dosaženo enzymatickou hydrolýzou banánových slupek. Kromě vysokého podílu cukrů v médiu byl také stanoven obsah polyfenolů a flavonoidů, u kterých již bylo dokázáno, že mají pozitivní vliv na kultivaci. Bylo dosaženo o 170% většího výtěžku bakteriální celulózy ve srovnání s kultivací na glukóze ve statické kultivaci a o 220% v dynamické kultivaci. Také kvalita vyprodukované celulózy byla vyšší, která byla hustější a pevnější.

Bakalářská práce dokládá, že banánové slupky jsou velmi vhodným substrátem s vysokým potenciálem pro kultivaci bakteriální celulózy, poskytuje vyšší výtěžky ve srovnání se standartními kultivacemi a ve vyšší kvalitě.

Budoucí práce by se mohla zaměřit na vliv polyfenolů a flavonoidů na kultivaci bakteriální celulózy detailněji. Nabízí se experimentovat s přípravou hydrolyzátu z banánových slupek v různých stádiích zralosti či rozkladu.

6. Literární zdroje

- [1] 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* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2012, **12**(1), 75-80 [cit. 2021-11-27]. ISSN 1567-1739. Dostupné z: doi:10.1016/j.cap.2011.04.045
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [3] NAEEM, Muhammad Awais, Qasim SIDDIQUI, Muhammad MUSHTAQ, Amjad FAROOQ, Zengyuan PANG a Qufu WEI. Insitu Self-Assembly of Bacterial Cellulose on Banana Fibers Extracted from Peels. *Journal of natural fibers* [online]. Abingdon: Taylor & Francis, 2020, **17**(9), 1317-1328 [cit. 2021-11-28]. ISSN 1544-0478. Dostupné z: doi:10.1080/15440478.2018.1563580
- [4] WANG, Jing, Javad TAVAKOLI a Youhong TANG. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate polymers* [online]. OXFORD: Elsevier, 2019, **219**, 63-76 [cit. 2021-11-17]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.05.008
- [5] 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>
- [6] ULLAH, Hanif, Helder ALMEIDA SANTOS a Taous KHAN. Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery. *Cellulose (London)* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, **23**(4), 2291-2314 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0969-0239. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-016-0986-y
- [7] CZAJA, Wojciech, Alina KRYSTYNOWICZ, Stanislaw BIELECKI a R. Malcolm BROWN. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials* [online]. OXFORD: Elsevier, 2006, **27**(2), 145-151 [cit. 2021-11-28]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.035
- [8] LUO, Honglin, Haiyong AO, Gen LI, Wei LI, Guangyao XIONG, Yong ZHU a Yizao WAN. Bacterial cellulose/graphene oxide nanocomposite as a novel drug delivery system. *Current Applied Physics*. 2017, **17**(2), 249-254. ISSN 15671739. Dostupné z: doi:10.1016/j.cap.2016.12.001
- [9] ZHONG, Chunyan. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose.

Frontiers in bioengineering and biotechnology [online]. Switzerland: Frontiers Research Foundation, 2020, **8**, 605374-605374 [cit. 2021-11-29]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.605374

- [10] 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>
- [11] 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>
- [12] HUR, Dong Hoon, Hong-soon RHEE, Jae Hyung LEE, Woo Yong SHIM, Tae Yong KIM, Sang Yup LEE, Jin Hwan PARK a Ki Jun JEONG. Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene. *Biochemical engineering journal* [online]. Elsevier B.V, 2020, **156**, 107527 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2020.107527
- [13] CZAJA, Wojciech K, David J YOUNG, Marek KAWECKI a R. Malcolm BROWN. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules* [online]. WASHINGTON: American Chemical Society, 2007, **8**(1), 1-12 [cit. 2021-11-28]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060620d
- [14] 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
- [15] 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* [online]. Japan: Elsevier B.V, 2015, **120**(4), 444-449 [cit. 2021-11-16]. ISSN 1389-1723.
- [16] CHAO, Yaping, Makoto MITARAI, Yasushi SUGANO a Makoto SHODA. Effect of Addition of Water-Soluble Polysaccharides on Bacterial Cellulose Production in a 50-L Airlift Reactor. *Biotechnology progress* [online]. USA: American Chemical Society, 2001, **17**(4), 781-785 [cit. 2021-11-16]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp010046b
- [17] CHENG, Hai-peng, Pei-ming WANG, Jech-wei CHEN a Wen-teng WU. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnology and applied biochemistry* [online]. London: Portland Press, 2002, **35**(Pt 2), 125-132 [cit. 2021-11-16]. ISSN 0885-4513. Dostupné z: doi:10.1042/BA20010066

- [18] LIN, Shin-ping, Iris LOIRA CALVAR, Jeffrey M CATCHMARK, Je-ruei LIU, Ali DEMIRCI a Kuan-chen CHENG. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose (London)* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, **20**(5), 2191-2219 [cit. 2021-11-28]. ISSN 0969-0239. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-013-9994-3
- [19] MUHSININ, Soni, Nesya Tiara PUTRI, Rahma ZISKA a Garnadi JAFAR. Bacterial cellulose from fermented banana peels (*Musa paradisiaca*) by *Acetobacter xylinum* as matrix of biocellulose mask. *Journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. Cuddalore: Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2017, **9**(2), 159-162 [cit. 2021-11-29].
- [20] PETERSEN, Nathan a Paul GATENHOLM. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, **91**(5), 1277-1286 [cit. 2021-11-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3432-y
- [21] FILLAT, Amanda, Josefina MARTÍNEZ, Cristina VALLS, et al. Bacterial cellulose for increasing barrier properties of paper products. *Cellulose (London)* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2018, **25**(10), 6093-6105 [cit. 2021-11-27]. ISSN 0969-0239. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-018-1967-0
- [22] 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>
- [23] 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>
- [24] 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>
- [25] HUR, Dong Hoon, Hong-soon RHEE, Jae Hyung LEE, Woo Yong SHIM, Tae Yong KIM, Sang Yup LEE, Jin Hwan PARK a Ki Jun JEONG. Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene. *Biochemical engineering journal* [online]. Elsevier B.V, 2020, **156**, 107527 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2020.107527

- [27] SIJABAT, Edwin K, Ahmad NURUDDIN, Pingkan ADITIAWATI a Bambang SUNENDAR PURWASASMITA. Flat sheet membrane composite for desalinisation applications based on Bacterial Nanocellulose (BNC) from banana peel waste, cellulose, and silica. *Materials Research Express* [online]. IOP Publishing, 2020, 7(10) [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1088/2053-1591/abba3f
- [29] ŠACHLOVÁ, Ž. *Využití odpadů z potravinářských výrob.* Brno, 2010 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 30s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, Csc.
- [28] HENZELOVÁ, E., *Největším pěstitelem banánů je Indie*, 9.11.2020, Statistiky a My; Dostupné: <https://www.statistikaamy.cz/2020/11/09/nejvetsim-pestitelem-bananu-je-indie>
- [30] McCance a Widdowson's: *The Composition of Foods*, 6. Summary edition, Royal Society of Chemistry Cambridge a Food Standard Agency, 2008, ISBN 978-0-85404-428-3
- [31] OBEROI, Harinder Singh, Praveen V VADLANI, Lavudi SAIDA, Sunil BANSAL a Joshua D HUGHES. Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Waste management (Elmsford)* [online]. OXFORD: Elsevier, 2011, 31(7), 1576-1584 [cit. 2022-05-25]. ISSN 0956-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2011.02.007
- [32] KHAWAS, Prerna a Sankar Chandra DEKA. Comparative Nutritional, Functional, Morphological, and Diffractogram Study on Culinary Banana (Musa ABB) Peel at Various Stages of Development. *International journal of food properties* [online]. PHILADELPHIA: Taylor & Francis, 2016, 19(12), 2832-2853 [cit. 2022-05-24]. ISSN 1094-2912. Dostupné z: doi:10.1080/10942912.2016.1141296

7. Seznam použitých zkratk

BC – bakteriální celulóza

RC – rostlinná celulóza

PHA – polyhydroxyalkanoláty

UV – ultrafialový

DNS – metoda s využitím dinitrosalicylové kyseliny

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

pO₂ – parciální tlak kyslíku