



Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu

Gökhan GÜNDÜZ¹, Nejla AŞIK¹, Deniz AYDEMİR¹, Ayşenur KILIÇ²

Özet

Bu çalışmada bakteriyel selüloz (BC) *Gluconacetobacter hansenii* (Gossele et al.) kullanılarak, saf selüloz elde edilmiş ve bazı özellikleri incelenerek literatür ile karşılaştırılmıştır. Hestrin ve Schramm (HS) ortamında iki tekrarlı olmak üzere 100 ml'lik deney örnekleri hazırlandı. 14 günlük süre sonunda BC tabakası elde edilerek morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiş, selüloz zinciri çaplarının 20 nm – 75 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Su tutma kapasitesi ise tam kuru ağırlıklarının 91 – 109 katı olarak hesaplanmıştır. Selüloz verimi ise sırasıyla 0,81 g/l ve 0,84 g/l olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, XRD, FTIR ve TGA analizleri de yapılmış ve MCC ile karşılaştırılmış ve benzer yapıda olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, kullanılan suş'un bakteriyel selüloz üretimi için uygun olduğu söylenebilir ve bu özellikleri sayesinde; gıda, kozmetik, ilaç, kağıt ve kompozit yapımında hammadde ve dolgu maddesi olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Gluconacetobacter Hansenii, TGA, SEM, XRD, FTIR, Verim

The Production and Characterization of Bacterial Cellulose

Abstract

Some properties of bacterial cellulose (BC) *Gluconacetobacter hansenii* (Gossele et al.) after production were determined and compared with microcrystalline cellulose (MCC). The BC test specimens were prepared with standard Hestrin and Schramm (HS) medium. The obtained pellicels were evaluated after 14 days incubation. According to SEM analysis the diameter of the cellulose fibrils were measured between 20 nm and 75 nm. The water holding capacity was calculated 91 to 109 times higher than dry weight. The cellulose yield of BC was between 0,81 g/l and 0,84 g/l. XRD, FTIR and TGA analysis were done and compared with MCC. The obtained results and comparison between the strain and MCC showed similarity. According to the results the obtained BC can be used for food, cosmetic, medicine, paper and composites as raw material or filler.

Key Words: Gluconacetobacter Hansenii, TGA, SEM, XRD, FTIR, Yield

Giriş

Selüloz dünyada en fazla bulunan biyopolimerlerden birisidir. Odun, pamuk ve diğer lignoselülozik bitkisel maddelerde bulunur. Selüloz ayrıca; algler, tulumular (deniz canlıları) ve bazı bakteriler tarafından da sentezlenir (Moon et al., 2011).

Selüloz I olarak da bilinen doğal bitki selüloz nanofibrilleri bitki hücresinin çeperinde hemiselülozlar ve lignin ile beraber bulunmaktadır. Bu durum, selülozun elde edilmesi için ilave kimyasal işlemlerin yapılmasına ve maliyet artışına neden olmaktadır. Bakteriyel selüloz (BC) nanofibrilleri ise kristal yapıda, yüksek molekül kütleli, hidrojen bağları ile bağlanmış saf selüloz I'e sahiptir. BC'deki selüloz nanofibrillerinin Young modülü 138-150 GPa civarında olup çeliğin (200 GPa) değerine yaklaşmaktadır (Olsson et al., 2010, Wan et al., 2007).

Diğer taraftan, BC yüksek derecede hidrofilik olup, su tutma kapasitesi kuru ağırlığının 100 katına kadar ulaşabilmekte ve daha kolay biyolojik parçalanabilme özelliği göstererek doğal bitki selülozundan farklılık göstermektedir (Gama et al., 2013).

¹Bartın Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, 74100 Bartın/Türkiye

²Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, 46100 Kahramanmaraş/Türkiye

Günümüzde BC ile yapılan çalışmalarda tıp ve eczacılık gibi alanlar da önem kazanmaktadır. Özellikle, yapay damar yapımı, hidroksiapatit ile kemik dokusunun iyileştirilmesi, eklem protezleri ve yanık tedavisi, yara bantları ve kozmetik gibi uygulamaları yapılmaktadır (Wan et al., 2007; Svensson et al., 2005; Putra et al., 2009; Fu et al., 2013; Jonas ve Farah, 1998; Ioelovich, 2013).

Bakteriyel selüloz kurutulduktan sonra, ses dalgalarını iyi bir şekilde iletebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı bakteriyel selülozun akustik membran olarak kullanılabilirdiği belirtilmiştir (Hu et al., 2014)

Bakteriyel selüloz Nata de Coco ve Kombuça Çayı olarak da değerlendirilmektedir. Nata de Coco gıda olarak şekerlenerek tüketilmekte, Kombuça çayının ise fermantasyon sonucu oluşan sıvı kısmından faydalanılmaktadır (Goh et al., 2012).

Mühendislikte ise kompozit malzemeler önem kazanmış durumdadır. Bu nedenle, malzemelerin fiziksel ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için farklı dolgu maddeleri kullanılmaktadır. Bu dolgu maddeleri inorganik veya organik olup farklı kullanım amaçlarına dönüktür. Bakteriyel selülozun içerisine ilave parçacıklar katılarak oluşturulan kompozitleri de elektronik alanda kullanım alanı bulmaktadır (Liang et al., 2012; Ateş ve Aztekin, 2011).

Bakteriyel selülozun artan öneminden dolayı üretim yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Statik ve bioreaktörlerde yapılan üretiminde; karbon kaynakları, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı optimize edilmeye çalışılmaktadır. Bu sayede, hem üretim miktarı hem de fermantasyon koşullarının kontrol edilmesi sayesinde selülozun yoğunluğu, kristalitesi, membran geçirgenliği, çekme direnci gibi özelliklerinin ayarlanabilmesi sağlanabilmektedir. Diğer taraftan, selülozu üreten bakteri kaynağının yapısında değişiklikler yapılarak da verimin artması sağlanabilmektedir (Gama et al., 2013; Vandamme et al., 1998; Yamanaka et al., 2000; Watanabe et al., 1998; Bungay ve Serafica, 2000; Hungund ve Gupta, 2010).

Bu çalışmada, katma değeri yüksek alanlardaki kullanabilme imkanından dolayı bakteriyel selülozun hammadde olarak üretilmesi ve bazı özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Üretim sonunda taramalı elektron mikroskobu ile morfolojisi incelenecektir. Ayrıca, FTIR, TGA, XRD analizleri yapılarak elde edilen sonuçlar mikrokristalin selüloz (MCC) ile kıyaslanacaktır. Diğer taraftan, bakteriyel selülozun su ilişkileri ve verimi de incelenecektir. Elde edilen ve tanımlanan bakteriyel selüloz bundan sonra çeşitli modifikasyonlara tabi tutulabilir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Deney materyali olarak ATCC'den temin edilen *Gluconacetobacter hansenii* (Gossele et al.) Yamada et al. (ATCC® 23769™) kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. ATCC'den temin edilen *Gluconacetobacter hansenii* (Gossele et al.) Yamada et al. (ATCC® 23769™) kültürü

Karşılaştırma için kullanılan MCC, Sigma-Aldrich Co'dan temin edilmiştir ve parçacık boyutları 26 – 96 µm (ortalama 50 µm) arasında değişmektedir

Yöntem

Canlandırma İşlemi ve Stok Kültürü Hazırlanması (SK)

Liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş örnek olarak gelen numuneden SK hazırlanması için 50 ml Hestrin ve Schramm (HS) ortamı hazırlanmıştır. HS için aşağıda verilen formül uygulamıştır (Hestrin ve Schramm, 1954).

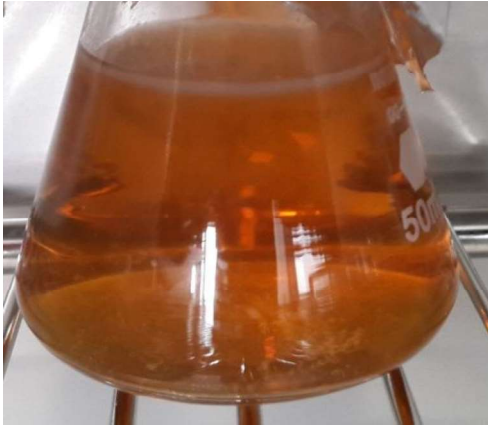
%2	(w/v) D-Glucose
%0.5	(w/v) Peptone
%0.5	(w/v) Yeast Extract
%0.27	(w/v) di-Sodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄)
%0.115	(w/v) Citric Acid

Prosedür

Liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş cam tüpün ucu, ateşle ısıtılarak ve üzerine soğuk steril destile su damlatılarak çatlatılmış, açılan kısımdan içerisindeki pamuk bir cımbız ile çıkarılmıştır. İçindeki bakteri örneğini HS içine aktarmak için tüpün içine 1-2 damla HS damlatılmış ve hazırlanmış olan 50 ml HS içine konulup çalkalanmış ve 27°C sıcaklık %65 bağıl nem olan ortamda sarsılmayacak şekilde 1 hafta beklemeye alınmıştır.

Bütün işlemler Laminar Hood (LH) içinde ve önce otoklav uygulanarak yapılmıştır (121°C, 20 dakika). LH ve tüm kullanılan malzemeler cımbız, eppendorf tüp, pastör pipeti vs. steril olması için deneyler öncesinde etanol ile temizlenerek 1 gece boyunca UV lambası altında bekletilmiştir.

1 hafta sonunda Şekil 2'de görülen HS karışımı üzerinde oluşan BC tabakası steril eldiven ile alınarak HS içine sıkıldı. SK için hazırlanan bakteri kültürü, %80 Gliserin ve %20 Destile Su karışımı ile beraber karıştırılarak 0.5 ml (Gliserin+Destile Su) ve 1.0 ml Bakteri kültürü şeklinde hazırlanıp 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içine aktarıldı ve -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 2. Bir haftalık bekleme süresi sonrasında canlandırma işlemi sonucunda oluşan BC tabakası ve stok kültürü

Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Selülozun Üretimi

100 ml olmak üzere iki tekrarlı HS hazırlandı. Hazırlanan HS 250 ml'lik erlenmayer'lere konularak içerisine daha önce hazırlanan (SK)'den birer adet ilave edildi ve 27°C, % 65 Bağıl Nem'de beklemeye alındı. Bu karışım 14 gün bekletildi ve daha sonra içerisinden yüzeyde oluşan BC – tabakası alınarak 1 saat kaynatıldı ve %2'lik NaOH ile 80°C

derecedeki su banyosunda 2 saat bekletildi. Daha sonra, akan suyun altında 1 gece durulandı ve destile su ile tekrar durulanarak pH 7'ye sabitlendi.

BC veriminin incelenmesi

Durulanan BC – tabakası 20 dakika eğimli bir düzlemde bekletilerek fazla suyun uzaklaşması sağlandı. Daha sonra tartılan numuneler kilitli poşet içine konularak -15 de donduruldu. Dondurulan numuneler dondurularak kurutuldu ve daha sonra SEM, TGA, XRD ve FTIR analizlerine tabi tutuldu (Şekil 3).

SEM Analizi

Dondurularak kurutulmuş deney parçaları vakum ortamında altınla kaplanarak SEM analizine tabi tutulmuştur. SEM analizi için 2000 V - 4000 V arası güç ve (BSED detektör Z Cont. yüksek vakum ile) 1-2 kV arası bir ayar düzeni uygulanarak görüntü alınmıştır.



Şekil 3. Dondurularak kurutulmuş olan BC numunesi.

TGA Analizi

TGA analizi için, SII Model TG/DTA 7200 EXSTRA (Made in Japan) kullanılmıştır. Dondurularak kurutulmuş bakteriyel selülozun termal özellikleri; 5,14 mg numune hazırlanarak, 10°/dak ile 25 – 650°C arasında azot ortamında yapılarak belirlenmiştir. DTG eğrisi ise MS Excel Ofis programı kullanılarak hazırlanmıştır.

XRD Analizi

XRD Analizi, PANalytical EMPYREAN (Made in Netherlands) cihazı kullanılarak yapılmıştır. X – Işını tüpünün bakır hedefi vardır ve tüp voltajı 40 kV'dır. Tarama hızı 5°/dak ve tarama aralığı 10° - 50° arasında belirlenmiştir. Kristalinite değerinin belirlenmesi için Segal tarafından kullanılan pik yüksekliği (Peak height) metodundan ve Curve Fitting metodundan yararlanılmıştır. BC için, $2\theta = 10^\circ - 25^\circ$; MCC için, $2\theta = 10^\circ - 30^\circ$ haricindeki lineer bölgeler hesaplama dışı bırakılmıştır.

Segal Metodu:

$$CI = 100 \times \frac{I_{200} - I_{non-cr}}{I_{200}} [\%]$$

Burada BC ve MCC için sırasıyla, I_{200} 2θ açısının en yüksek olduğu 14.08° ve 22.68° deki pik değerini ve I_{non-cr} ise 2θ 'nın 18.84° ve 18.61° deki taban çizgisindeki kristal olmayan bölgesinde meydana gelen kırınım yoğunluğunun değeridir (Cheng et al., 2009; Terinte et al., 2011).

Curve Fitting Metodu:

$$CI = 100 \times \frac{I_{cr\ peak\ 1} + I_{cr\ peak\ 2}}{I_{non-cr} + I_{cr\ peak\ 1} + I_{cr\ peak\ 2}} [\%]$$

Bu eşitliğin hesaplanmasında ise BC ve MCC için sırasıyla; $I_{cr\ peak\ 1}$ birinci pik değerinin altındaki kırınım alanını ($2\theta = 11.79^\circ - 16.60^\circ$) ve ($2\theta = 12.78^\circ - 18.62^\circ$), $I_{cr\ peak\ 2}$ ise ikinci pik değerinin altındaki kırınım alanının yoğunluğunu gösteriyor ($2\theta = 20.58^\circ - 24.45^\circ$) ve ($2\theta = 18.62^\circ - 25.49^\circ$). I_{non-cr} ise kristalin olmayan bölgelerdeki kırınım yoğunluğunu alanını gösteriyor (Ibbett et al., 2008).

FTIR Analizi

Dondurularak kurutulup hazırlanan Bakteriyel Selülozun FTIR analizi ($4000-800\text{ cm}^{-1}$) Shimadzu IRAffinity-1 FTIR (Made in Japan) kullanılarak 4 cm^{-1} çözünürlükte ve numune başına 32 tarama ile yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Rutubet Değerleri ve Verime Ait Sonuçlar

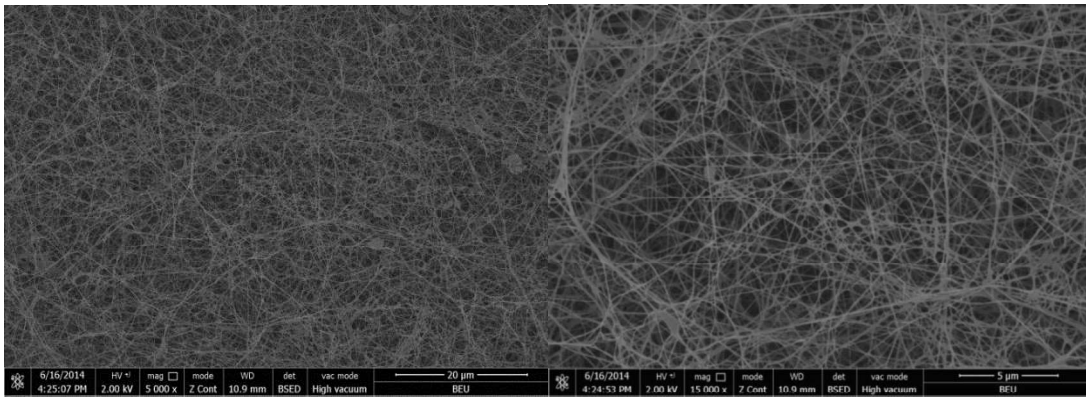
Deneyler sonucunda 2 adet numuneye ilişkin yaş ağırlık ($20\text{ dk } 45^\circ$ eğimli bir düzlemde bekletildikten sonra) sırasıyla 7,44 g ve 9,26 g olmuştur. Tam kuru (freeze dried) ağırlıkları ise sırasıyla 0,081 ve 0,084 g olarak belirlenerek BC verimi sırasıyla 0.81 ve 0.84 g/l olarak hesaplanmıştır (Çizelge 1). Verim için aşağıdaki Tablo 1'deki değerlerle karşılaştırma yapıldığında büyük değişim olduğu gözlemlenmektedir. Bunun nedeni bakteri kültürünün türü ve canlılık durumu olarak söylenebilir.

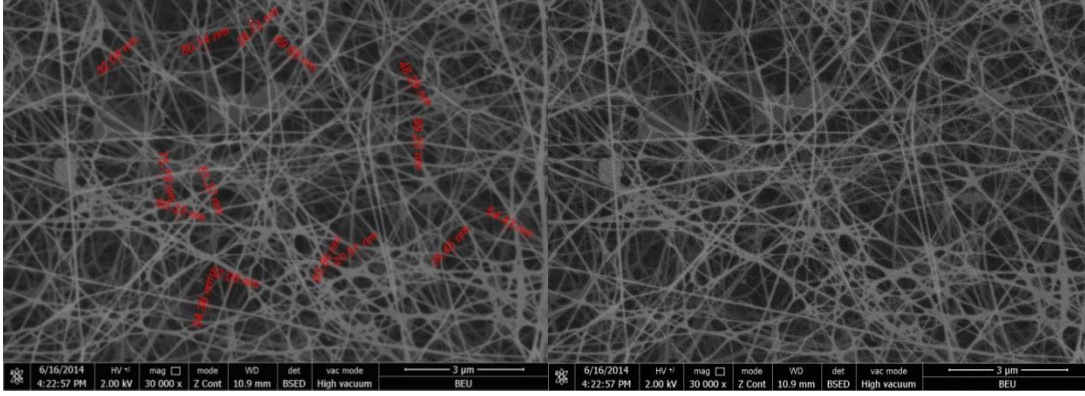
Çizelge 1. BC ve farklı karbon kaynaklarına ilişkin verim değerleri

İnkübasyon Ortamı (Medyum)	Üretim Metodu	Verim (g/l)	Süre (gün)	Kaynak
HS	Statik	2.1	13	(Castro et al., 2011)
Ananas Kabuğu	Statik	2.8	13	(Castro et al., 2011)
HS	Statik	8.3	7	(Keshk, 2014)
HS+(%0.5) Vitamin C	Statik	15.6	7	(Keshk, 2014)
HS	Statik	2.5	4	(Fabio et al., 2013)

SEM Analizine Ait Bulgular

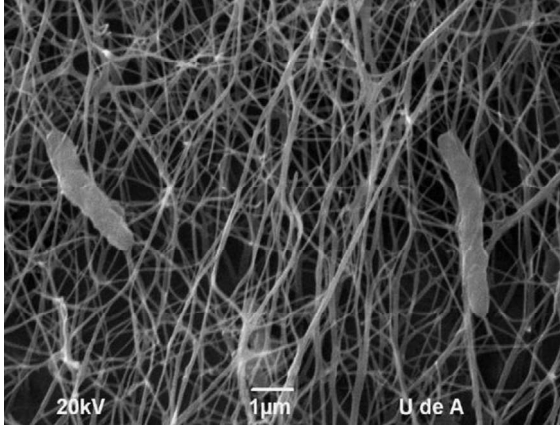
SEM sonuçları Şekil 4'da gösterilmiştir.





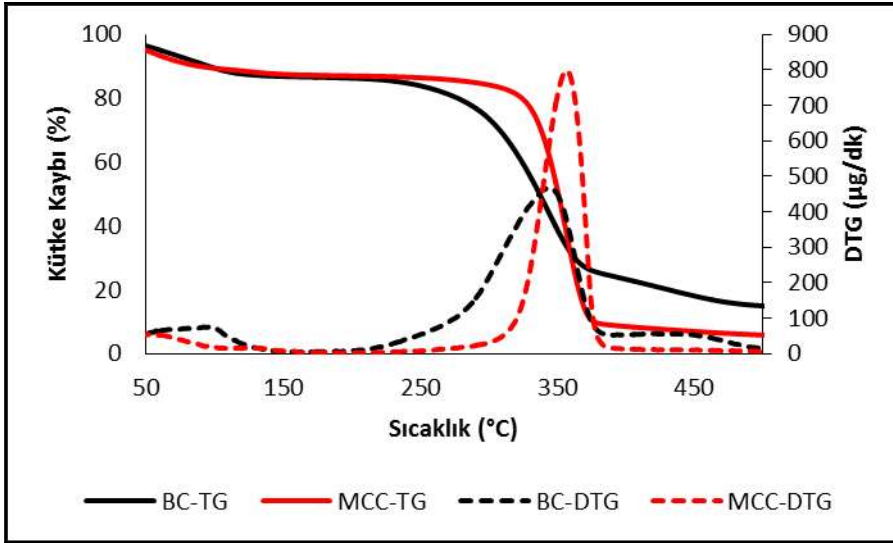
Şekil 4. a) BC'un x 5000 büyütmedeki görüntüsü, b) BC'un x 15000 büyütmedeki görüntüsü, c) BC'un x 30000 büyütmedeki görüntüsü ve selüloz zinciri çapları, d) BC'un x 30000 büyütmedeki görüntüsü

Elde edilen SEM sonuçlarına göre standart BC elde edilmiş ve selüloz zinciri çaplarının 20 nm – 75 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Farklı literatürdeki SEM görüntüleri ile karşılaştırma yapıldığında benzer yapıda oldukları söylenebilir (Şekil 5) (Castro et al., 2011).



Şekil 5. Farklı literatürdeki bakteriyel selüloz SEM görüntüsü (Castro et al., 2011)

TGA Analizine İlişkin Bulgular



Şekil 6. TGA analizi grafiği

Çizelge 2. TGA değerlerine ilişkin sıcaklık değerleri

	T _{%10} (°C)	T _{%50} (°C)	DTG _{max} (°C)	Kütle Kaybı (%)
BC	95.9	337	344,3	88,9
MCC	89.1	350	356.9	95,9

Selülozun degradasyon pik değeri 330°C – 370°C olarak bilinmektedir. Termal analiz sonuçlarına göre BC ve MCC için, DTG_{max} pik değerleri sırasıyla 344,3°C ve 356.9 °C olarak belirlenmiştir ve selülozun literatür değerleri ile uyum göstermektedir (Şekil 6) (Halib et al., 2012). T_{%10} değeri ise sırasıyla 95.9 °C ve 89.1 °C olarak belirlenen deney materyalinin T%50 değerleri de 337°C ve 350 °C olarak ölçülmüştür. Kütle kaybı ise sırasıyla, %88.9 ve %95.9 olarak bulunmuştur (Çizelge 2). Bu sonuçlara göre, BC'nin termal kararlılığının saf MCC'ye göre daha erken sıcaklıklarda degrade olduğu buna karşın daha az kütle kaybına uğradığı belirlenmiştir.

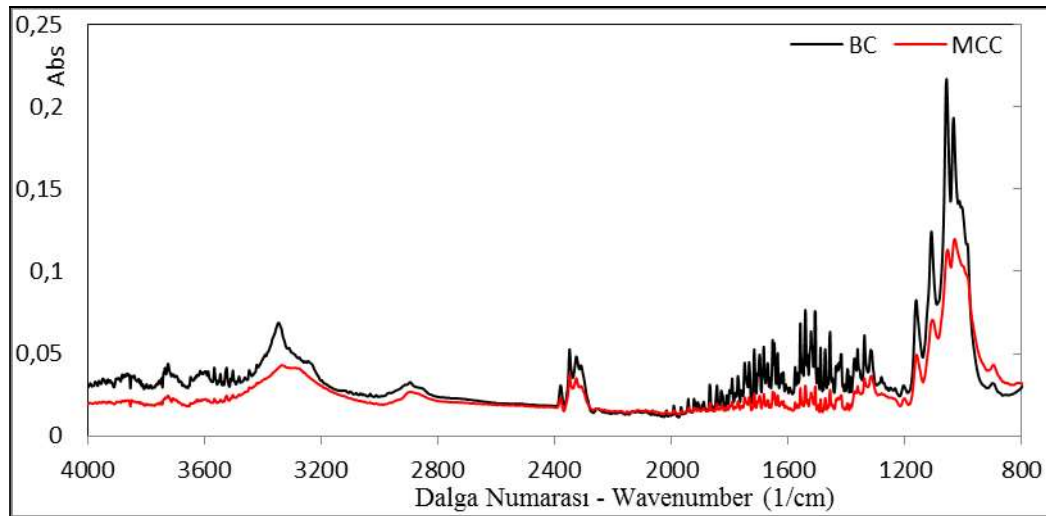
FTIR Analizine İlişkin Bulgular

FTIR analizi hidrojen bağlarının kuvvetini ve bu bağ ile bağlanmış kısımların incelenmesi için önemlidir. FTIR analizine ilişkin grafik Şekil 7'de verilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen değerler, saf selülozun pik değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bu değerler; 3000 cm⁻¹, 3350 cm⁻¹ ve 3400 cm⁻¹ - 3500 cm⁻¹ arası O-H bağı, 2880 cm⁻¹, 2800 cm⁻¹ - 2900 cm⁻¹ arası C-H bağı, 1100 cm⁻¹ - 1160 cm⁻¹ C-O-C bağı, 1035 cm⁻¹ - 1060 cm⁻¹ arası C-O bağı, 1300 cm⁻¹ C-H bağı ve 1400 cm⁻¹ CH₂ bağı göstermektedir (Fabio et al., 2013; Halib et al., 2012).

Diğer bir çalışmada pik değerleri sırasıyla, 1375 cm⁻¹ (C-H bağı), 1335 cm⁻¹ (O-H bağı), 1315 cm⁻¹ (CH₂ bağı), 1277 cm⁻¹ (C-H bağı) ve 1225 cm⁻¹ (O-H bağı) yapı içerisinde bulunan kristalin bölgelere işaret etmektedir (Castro et al., 2012).

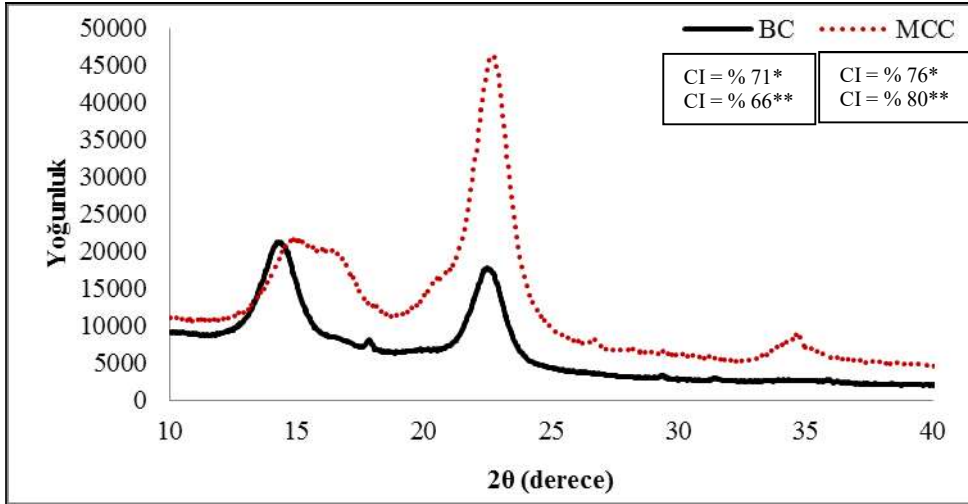
Çalışmada kullanılan bakteri kültüründen elde edilen selülozun pik değerleri sırasıyla, 3346 cm⁻¹, 2895 cm⁻¹, 1417 cm⁻¹, 1311 cm⁻¹, 1161 cm⁻¹, 1056 cm⁻¹, 1033 cm⁻¹ olarak bulunmuştur ve saf selüloza olan uygunluğu kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada, MCC ile elde edilen pik değerleri sırasıyla, 3336 cm⁻¹, 2895 cm⁻¹, 1417 cm⁻¹, 1313 cm⁻¹, 1161 cm⁻¹, 1053 cm⁻¹ ve 1029 cm⁻¹ olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre, üretilen BC saf MCC FTIR değerleri ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 7. BC'ye ait FTIR analiz grafiği

XRD Analizine İlişkin Bulgular



Şekil 8. BC'ye ait XRD analiz grafiği (*Segal metodu, ** Curve Fitting metodu)

Analizler sonucunda, iki ana pik değeri belirlenmiştir. Bu pik değerleri BC ve MCC için sırasıyla; 14.29°, 22.5° ve 14.93°, 22.68° olarak bulunmuştur. Kristalinitesi ise BC ve MCC için sırasıyla; Segal metodunda % 71 ve % 76, Curve fitting metodunda ise % 66 ve % 80 değerini vermiştir (Şekil 8). Bulunan değerler Çizelge 3'deki değerler ile karşılaştırıldığında birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Çizelge 3. Selüloza ait kristalinite değerleri

Test Örneği	Kristalinite (%)	Kaynak
Pamuk	78	(Terinte et al., 2011)
BC	82	(Keshk, 2014)
BC	75	(Grande et al., 2009)
MCC	77	(Keshk, 2014)

Öneriler

Deneyler sonucunda değerlendirilen numunelerin yaş ağırlıkları 7,44 g 9,26 g olarak belirlendi. Tam kuru ağırlıkları (dondurularak kurutulmuş) ise 0,081 g ve 0,084 g olarak ölçülmüştür. Verim ise sırasıyla 0,81 g/l ve 0,84 g/l olarak bulunmuştur. Su tutma kapasitesi ise % 9085 ve % 10923 olarak belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, tam kuru ağırlıklarınının 91 – 109 katı kadar su tutabilmektedir. SEM analizi sonuçlarına göre fibril çapları ortalama 20 nm – 75 nm olarak ölçülmüştür. Bu değerler nanoselüloz eldesi bakımından uygun bulunmuştur. Bakteriyel selülozun; FTIR, XRD, TGA analizi sonucunda MCC ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen selüloz bu özellikleri sayesinde; gıda, kozmetik, ilaç, kağıt ve kompozit yapımında hammadde ve dolgu maddesi olarak kullanılabilir.

Semboller

BC	: Bakteriyel Selüloz
MCC	: Mikrokristalin Selüloz
HS	: Hestrin-Schramm
SK	: Stok Kültür
SEM	: Scanning Electron Microscopy
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy
XRD	: X-ray Diffraction
TGA	: Thermogravimetric Analysis
nm	: Nanometre
mg	: Miligram

Teşekkür

Bu çalışmada, TÜBİTAK'a 2209 no'lu destek kapsamında, deney numunesinin hazırlanmasındaki yardımları için Dr. Esra Erbaş Kızıldaş (University of Maine) ve laboratuvar imkânlarının sağlanmasındaki yardımları için Doç. Dr. Hüseyin Sivrikaya ile Doç. Dr. Ayben Kılıç Pekgözlü'ye teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Ateş E, Aztekin K. 2011. Parçacık ve fiber takviyeli polimer kompozitlerin yoğunluk ve basma dayanımı özellikleri, *J. Fac. Eng. Arch. Gazi University*, Vol 26, No 2, 479-486.
- Bungay HR, Serafica GC. 2000. Production of Microbial Cellulose. US Patent Number: 6,071,727.
- Castro C, Zuluaga R, Álvarez C, Putaux JL, Gloria Caro G, Rojas OJ, Mondragon I, Ganán P. 2012. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* Genus, *Carbohydrate Polymers*, 89 (4): 1033-1037.
- Castro C, Zuluaga R, Putaux JL, Caroa G, Mondragon I, Ganán P, 2011. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, *Carbohydrate Polymers*, Volume 84, Issue 1, 11 February, Pages 96–102.
- Cheng KC, Catchmark JM, Demirci A. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis, *Journal of Biological Engineering*, 3 (12), doi:10.1186/1754-1611-3-12.
- Fabio P. Gomes, Nuno H.C.S. Silva, Eliane Trovatti, Luisa S. Serafim, Maria F. Duarte, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, Carmen S.R. Freire. 2013. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue, *Biomass and Bioenergy*, 55, 205-211.
- Fu L, Zhang J, Yang G. 2013. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair, *Carbohydrate Polymers*, 92: 1432– 1442.
- Gama M, Gatenholm P, Klemm D. 2013. Bacterial NanoCellulose A Sophisticated Multifunctional Material, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, International Standard Book Number-13: 978-1-4398-6992-5 (eBook - PDF).
- Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Karim AA, Bhat R. 2012. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II., *International Food Research Journal* 19(1): 153-158.
- Grande CJ, Torres FG, Gomez CM, Troncoso OP, Ferrer JC, Pastor JM. 2009. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites, *Materials Science and Engineering C*, 29: 1098–1104.
- Halib N, Amin MCIM, Ahmad I. 2012. Physicochemical Properties and Characterization of Nata de Coco from Local Food Industries as a Source of Cellulose, *Sains Malaysiana*, 41(2): 205–211.
- Hestrin S, Schramm M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose *Biochem. J.* (1954) 58 (345–352)
- Hu W, Chen S, Yang J, Li Z, Wang H, 2014. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites, *Carbohydrate Polymers*, 10: 1043–1060.
- Hungund BS, Gupta SG. 2010. Improved Production of Bacterial Cellulose From *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, Volume 2(5): 127-133.

- Ibbett R, Domvoglou D, Phillips DAS. 2008. The Hydrolysis and Recrystallisation of Lyocell and Comparative Cellulosic Fibres in Solutions of Mineral Acid, *Cellulose*, 15: 241-254.
- Ioelovich M. 2013. Nanoparticles of amorphous cellulose and their properties, *American Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1): 41-45.
- Jonas R and Farah LF. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degrad Stabil*, 59, 101–106.
- Keshk SMAS. 2014. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydrate Polymers*, 99, 98– 100.
- Liang HW, Guan QF, Zhu-Zhu, Song LT, Yao HB, Lei X, Yu SH. 2012. Highly conductive and stretchable conductors fabricated from bacterial cellulose, *NPG Asia Materials*, 4, e19; doi:10.1038/am.2012.34.
- Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites, *Chem. Soc. Rev.*, 40: 3941–3994.
- Olsson R.T, Samir A, Salazar-Alvarez G, Belova L, Ström V, Berglund L.A., Ikkala O, Nogués J, Gedde U.W. 2010, Making Flexible Magnetic Aerogels and Stiff Magnetic Nanopaper Using Cellulose Nanofibrils as Templates, *Nature Nanotechnology*, Vol 5, 584-588.
- Putra A, Kakugo A, Furukawa H, Gong J.P. 2009. Orientated Bacterial Cellulose Culture Controlled by Liquid Substrate of Silicone Oil with Different Viscosity and Thickness, *Polymer Journal*, Vol. 41, No. 9, pp. 764–770.
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials*, 26: 419–431.
- Terinte N, Ibbett R, Schuster KC. 2011. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by x – ray diffraction (WAXD): comparison between measurement techniques, *Lenzinger Berichte*, 89: 118-131.
- Vandamme, E.J., Baets, D.S., Vanbaelen, Joris, K. and Wulf DP. 1998. Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential, *Polymer Degradation and Stability*, 59: 93-99.
- Wan YZ, Huang Y, Yuan CD, Raman S, Zhu Y, Jiang HJ, He F, Gao C. 2007. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications, *Materials Science and Engineering C*, 27: 855–864.
- Watanabe K, Tabuchi M, Ishikawa A, Takemura H, Tsuchida T, Morinaga Y, Yoshinaga F. 1998. *Acetobacter xylinum* mutant with high cellulose productivity and an ordered structure. *Biosci Biotech Bioch*, 62 (7): 1290– 1292.
- Yamanaka S, Ishihara M, Sugiyama J. 2000. Structural modification of bacterial cellulose, *Cellulose*, 7 (3), 213–225.