

Sara Sohkanen

BAKTEERINANOSELLULOOSAN TUOT- TAMINEN BIOSENSORISOVELLUKSIIN

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Tarkastaja: Ville Santala
Huhtikuu 2021

TIIVISTELMÄ

Sara Sohkanen: Bakterinanoselluloosan tuottaminen biosensorisovelluksiin
Producing bacterial nanocellulose for biosensor applications
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan TkK-tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2021

Bakterinanoselluloosalla tarkoitetaan nimensä mukaisesti nanomittakaavan selluloosaa, joka on tuotettu hyödyntäen sitä luonnostaan huomattavia määriä tuottavien bakteerien aineenvaihduntaa. Bakterinanoselluloosasta tekevät mielenkiintoisen sen erityiset materiaaliominaisuudet, kuten pintakemian muokattavuus, bioyhteensopivuus ja biohajoavuus. Sen valmistusprosessi on ympäristöystävällinen ja kestävä kehityksen mukainen, mikä tekee siitä tärkeän esimerkiksi mahdollisena pakkausmuovin korvaajana. Bakterinanoselluloosan käyttöä on tutkittu hyvin monialaisissa sovelluksissa. Esimerkiksi kudosteknologian sovelluksiin sitä on viime vuosina alettu käyttää jo kaupallisissa tuotteissa. Tutkimus kohdistuu myös monimutkaisempiin sovelluksiin, kuten erityyppisiin biosensoreihin.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään nanoselluloosan tuottamista bakteereilla. Tarkastelun kohteena ovat tuotantoprosessin eri osa-alueet, kuten raaka-aineet ja viljelymenetelmät. Erilaisten viljelymenetelmien, kuten bioreaktoreiden, avulla pyritään kasvattamaan bakterinanoselluloosan tuotannon mittakaavaa kaupallisesti kannattavaksi. Raaka-aineina on perinteisesti käytettyjen sakkariidien lisäksi tutkittu myös erilaisia jätemateriaaleja. Lisäksi työssä perehdytään käytettyihin bakteereihin, niiden muokkaukseen synteettisen biologian keinoin sekä selluloosan biosynteesiin. Lopuksi tarkastellaan vielä tuotetun materiaalin jatkojalostusta ja sen soveltamista erilaisissa biosensoreissa. Työn tarkoitus on siis perehtyä bakterinanoselluloosan tuottamiseen, prosessin kehitykseen sekä eri osa-alueilla toteutettuihin muutoksiin ja niiden vaikutuksiin.

Katsauksessa selviää, että bakterinanoselluloosan laajempaa käyttöä rajoittavat vielä tois- taiseksi tuottavuuden parantamisen vaikutus materiaalin rakenteellisiin ominaisuuksiin sekä sen tuotannon haasteet, joista tärkeimpinä voidaan pitää prosessin mittakaavan kasvattamista, teo- listamista sekä kustannusten vähentämistä. Bakterinanoselluloosaa pidetään kuitenkin lupaa- vana materiaalina moniin erilaisiin sovelluksiin ja esimerkiksi siihen perustuvia kaupallisia biosen- soreita voidaan odottaa arviolta tulevien vuosien kuluessa.

Avainsanat: bakterinanoselluloosa, biomateriaalit, biosensorit, biosynteesi, synteettinen biologia

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. NANOSELLULOOSA	3
2.1 Nanoselluloosan molekyyli rakenne ja yleiset ominaisuudet.....	3
2.2 Eri tuotantotavat ja vertailu.....	4
3. BAKTEERINANOSELLULOOSAN TUOTTAMINEN.....	7
3.1 Tuotannon tilanne nykyään	7
3.2 Raaka-aineet ja viljelymenetelmät.....	8
3.2.1 Staattinen viljelmä.....	9
3.2.2 Ravisteluviljelmä	9
3.2.3 Bioreaktorit.....	10
3.3 Biosynteesi	12
3.3.1 Aineenvaihduntareitti	13
3.3.2 Bakteerien geneettinen muokkaus	14
3.4 Materiaalin jatkojalostus.....	16
4. BAKTEERINANOSELLULOOSAN SOVELTAMINEN BIOSENSOREISSA	18
4.1 Biosensoreiden toimintaperiaate	18
4.2 Tutkimus ja käyttökohteet.....	19
5. JOHTOPÄÄTÖKSET	21
LÄHTEET	22

LYHENTEET JA MERKINNÄT

AAB	etikkahappobakteerit, engl. acetic acid bacteria
ATP	adenosiinitrifosfaatti
BNC	bakteerinanoselluloosa, engl. bacterial nanocellulose
c-di-GMP	syklinen diguanosiinifosfaatti
CNF	selluloosananofibrillit, engl. cellulose nanofibrils
CNC	selluloosananokiteet, engl. cellulose nanocrystals
CRISPR/Cas	työkalu, jota käytetään muun muassa tarkkaan genomien (DNA) muokkaukseen, engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (protein)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DP	polymerisaatioaste, engl. degree of polymerization
EMP-reitti	Embden-Meyerhof-Parnas-reitti, yleisin glykolyysityyppi
H-S medium	Hestrin-Schramm medium
MMR Tech	Mobile Matrix Reservoir Technology
PCS-RDB	muovikomposiiteista koostuvia kiekkoja hyödyntävä kiertokiekkoreaktori, engl. plastic composites supporting rotating disc bioreactor
UDP-glukoosi	uridiinidifosfaatti-glukoosi
UDP-GlcNAc	uridiinidifosfaatti-N-asetyyli-glukosamiini
UGPaasi	uridiinidifosfaatti-glukoosipyrofosforylaasi

1. JOHDANTO

Selluloosa on hyvin yleinen luonnosta saatava materiaali, jota voidaan hyödyntää monissa eri käyttötarkoituksissa. Sen suosiota nostaa myös materiaalin uusiutuvuus sekä kestävän kehityksen edistäminen. Viime aikoina paljon tutkimusta on kohdistunut nanoselluloosaan, jossa yhdistyvät selluloosan hyvät ominaisuudet ja nanomittakaavan materiaalien mahdollisuudet (Klemm et al. 2018). Nanoselluloosalla tarkoitetaan nanomittakaavan selluloosakuituja. Tällä hetkellä nanoselluloosaa käytetään muun muassa elintarviketeollisuudessa ja kosmetiikan raaka-aineena (Dufresne 2017). Viime vuosina markkinoille on tullut myös useita kudosteknologisia sovelluksia, kuten haavasidoksia ja implantteja (Klemm et al. 2018; Puoskari 2020). Nanoselluloosasta on moneksi sen bioyhteensopivuuden ja ei-toksisuuden ansiosta (Klemm et al. 2018).

Nanoselluloosaa voidaan tuottaa esimerkiksi kasvipiperäistä selluloosaa käsittelemällä. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoitus on kuitenkin syventyä sen tuottamiseen bakteerien metaboliaa hyödyntämällä. Tällä tavoin tuotettua nanoselluloosaa kutsutaan bakteerinanoselluloosaksi (tai bakteeriselluloosaksi). Bakteerinanoselluloosan tuottamisessa voidaan hyödyntää useita *Acetobacteraceae* perheen bakteereita, jotka tuottavat sitä luonnostaan ympärilleen suojaavaksi biofilmiksi (Singh et al. 2020). Bakteerinanoselluloosa on muita nanoselluloosatyyppisiä puhtaampaa ja 10 kertaa vahvempaa (Florea et al. 2016).

Tällä hetkellä bakteerinanoselluloosan laajempaa käyttöä rajoittavat sen tuotantoprosessit, joihin liittyy hankalasti automatisoitavia työvaiheita (Klemm et al. 2018). Tutkimus kohdistuukin pääosin prosessien parantamiseen uusien sovellusmahdollisuuksien ohella. Tuotantoprosesseja pyritään tehostamaan esimerkiksi kehittämällä bioreaktoreita ja muita tuotantoteknisiä ratkaisuja (Klemm et al. 2018). Selluloosan saantoa pyritään myös kasvattamaan prosessia optimoimalla sekä synteettisen biologian avulla. Synteettisen biologian avulla voidaan lisäksi luoda materiaaleihin kokonaan uusia ominaisuuksia (Singh et al. 2020).

Tässä työssä perehdytään bakteerinanoselluloosan tuottamisen lisäksi sen soveltamiseen biosensoreissa. Biosensorit perustuvat spesifien molekyylien sitoutumiseen ja sen aikaansaamaan havaittavissa olevaan vasteeseen (Sadana et al. 2011). Bakteeri-

nanoselluloosaa voitaisiin käyttää esimerkiksi biosensorisolujen kasvualustana tai sensoreina käytettävien komposiittien raaka-aineena. Biosensoreille löytyy käyttökohteita muun muassa biolääketieteen diagnostiikasta sekä ympäristöön liittyvästä analytiikasta. Sensoreiden avulla on mahdollista havaita esimerkiksi toksisia aineita vedessä. (Golmohammabi et al. 2017)

Luvussa 2 perehdytään nanoselluloosaan yleisesti ja vertaillaan sen eri tuotantotapojen vahvuuksia ja heikkouksia sekä tärkeimpiä sovelluskohteita. Luvussa 3 siirrytään käsittelemään bakteerinanoselluloosan tuottamista biosynteesin kautta sekä prosessin teollistamista. Lisäksi perehdytään tuotannon parantamiseen ja kehitykseen tuotantoteknisten ratkaisujen sekä synteettisen biologian avulla. Luvussa 4 käsitellään bakteerinanoselluloosan käyttöä erilaisissa biosensorisovelluksissa. Lopuksi luvussa 5 kootaan johdopäätökset bakteerinanoselluloosan tuottamisen nykytilasta ja tulevaisuudesta sekä sen sovelluksesta biosensoreissa.

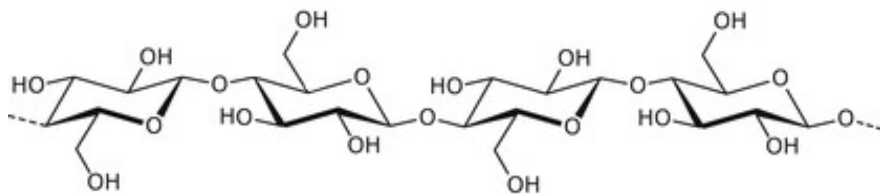
2. NANOSELLULOOSA

Nanoselluloosa on glukoosiyksiköistä koostuva biopolymeeri. Määritelmän mukaan nanoselluloosa sisältää vähintään yhden dimension nanomittakaavassa eli 1–100 nm. Nanoselluloosa, kuten selluloosa ylipäänsä, on ympäristöystävällinen ja biohajoava materiaali. Tämä tekee siitä kiinnostavan muun muassa kestävän kehityksen näkökulmasta. Nanoselluloosa voisi korvata esimerkiksi öljypohjaisen muovin käytön pakkausmateriaalina. Materiaalin monipuolisuus ja muokattavuus luo sille myös lukuisia muita sovellusmahdollisuuksia, joita vuonna 2008 perustettu Suomen Nanoselluloosakeskus pyrkii lisäämään entisestään. Kansainvälisellä tasolla selluloosananomateriaalien standardointia edistää TAPPI. (Kangas 2014)

Nanoselluloosaa on kolmea erilaista. Eri menetelmien avulla saadaan tuotettua selluloosananofibrillejä (CNF, engl. cellulose nanofibrils), selluloosananokiteitä (CNC, engl. cellulose nanocrystals) ja bakteerinanoselluloosaa (BNC, engl. bacterial nanocellulose) (Kangas 2014; Klemm et al. 2018). Kahta ensimmäistä voidaan tuottaa eristysmenetelmien kautta muun muassa kasvi- ja eläinperäisistä selluloosamateriaaleista (Kangas 2014). Suomessa merkittävä selluloosan lähde on puu. Tässä työssä tarkastellaan tarkemmin bakteerinanoselluloosaa eli bakteerien metaboliaa hyödyntämällä tuotettua nanoselluloosaa. Vertailun vuoksi tutustutaan myös lyhyesti kahteen muuhun nanoselluloosatyyppiin, sillä valmistustavat vaikuttavat osaltaan lopullisen tuotteen ominaisuuksiin ja siten myös sovellusmahdollisuuksiin. Molekyylirakenteeltaan nanoselluloosat ovat kuitenkin samanlaisia, ja joihinkin käyttökohteisiin soveltuu siten useampi nanoselluloosatyyppi. Tällöin materiaalin valintaan voi vaikuttaa esimerkiksi saatavuus ja hinta.

2.1 Nanoselluloosan molekyyli rakenne ja yleiset ominaisuudet

Selluloosa on homopolysakkaridi, eli se koostuu pelkästään D-glukoosi monomeereistä (kuva 1). Glukoosimolekyylit liittyvät toisiinsa $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosididoksilla muodostaen lineaarista ja tasomaista selluloosaketjua, jonka yksiköt ovat kiertyneet aina 180 astetta edelliseen verrattuna (Heinze 2015; Klemm et al. 2018). Ketjujen pituus eli polymerisaatioaste (DP, engl. degree of polymerization) vaihtelee selluloosan lähteen mukaan (Klemm et al. 2018). Ketjut liittyvät toisiinsa hydroksyyliyhymien välille syntyvien vetysidosten ja van der Waalsin voimien avulla muodostaen kuitumaisia rakenteita (Dai et al. 2019).



Kuva 1. Selluloosamolekyylin rakenne (Muokattu lähteestä Heinze 2015).

Suuremmissa mittakaavassa nanoselluloosakuitujen muodostama rakenne riippuu niiden alkuperästä ja käsittelystä. Molekyylin kemialliseen rakenteeseen voidaan vaikuttaa esimerkiksi hapettamalla hydroksyyliiryhmiä (Habibi 2014).

Selluloosananomateriaaleissa yhdistyvät sekä selluloosan että nanomateriaalien ominaisuudet. Selluloosan tavoin ne ovat hydrofiilisiä, helposti kemiallisesti muokattavia ja niiden muodostamat kuiturakenteet ovat monipuolisia. Nanomittakaava taas tekee niistä reaktiivisempia sekä parantaa sitoutumiskykyä pienen koon ja suuren ominaispinta-alan ansiosta. VTT:n raportin mukaan materiaalin tärkeimmät ominaisuudet ovat lujuus, suuri aktiivinen partikkelipinta ja verkoston muodostus, kalvon muodostus ja korkea järjestyneisyys sekä geelin muodostus vesiliuoksessa. (Kangas 2014)

Eri tavoin tuotetuilla nanoselluloosamateriaaleilla on toisistaan eroavat ominaisuudet, sillä valmistusprosessit vaikuttavat niihin. Materiaalien ominaisuuksia voidaan myös muokata valmistuksen jälkeen esimerkiksi kemiallisesti (Habibi 2014). Bakteerinanoselluloosan tapauksessa muokkauksiin pystytään myös viljelyn aikana ja ennen viljelyä hyödyntämällä synteettistä biologiaa. Synteettisen biologian menetelmin nanoselluloosaa tuottavat bakteerisolut voidaan uudelleenohjelmoida muokkaamalla niiden DNA:ta (Singh et al. 2020).

2.2 Eri tuotantotavat ja vertailu

Nanoselluloosaa voidaan tuottaa erottamalla sitä lähdemateriaalista kemiallisesti ja/tai mekaanisesti sekä hyödyntäen bakteerien luonnollista biosynteesiä (Dai et al. 2019). Selluloosananofibrillit (CNF) valmistetaan mekaanisen käsittelyn avulla ja selluloosananokiteet (CNC) happohydrolyysiä hyödyntäen (Kangas 2014). Kemiallisia ja mekaanisia menetelmiä voidaan myös yhdistää. Näillä menetelmillä tuotettu nanoselluloosa on heterogeenistä, ja esimerkiksi puuraaka-aineen tapauksessa selluloosasta täytyy erottaa hemiselluloosa ja ligniini (Dufresne 2017). Bakteerinanoselluloosa (BNC) on sen sijaan puhdasta ja bakteerit tuottavat sitä ympäristöönsä polymerisoimalla glukoosia. Eri tavoin tuotettua nanoselluloosaa vertaillaan taulukossa 1.

Taulukko 1. Selluloosananomateriaalien vertailu. (Perustuu lähteisiin Kangas 2014¹; Klemm et al. 2018²)

	Edut	Ongelmat	Sovelluksia
BNC	<ul style="list-style-type: none"> • Korkein kiteisyysaste ja puhtaus² • Ominaisuuksien muokaus mahdollista synteettisellä biologialla¹ • Muodostaa stabiilin hydrogeelin (jopa 99 % vettä)² • Mahdollisuus muodostaa kompleksisia 3D-muotoja muotin avulla² • Korkea bioyhteensopiavuus^{1,2}, ei-toksinen², luja^{1,2} 	<ul style="list-style-type: none"> • Teollistaminen, tuototmäärä, tuotannon hinta² 	<ul style="list-style-type: none"> • Elintarviketeollisuus^{1,2} • Implantit, haavasisidos, muut kudosteknologiset sovellukset²
CNF	<ul style="list-style-type: none"> • Tutkittu pitkään^{1,2} • Raaka-aineen hyvä saatavuus (puu)¹ • Koneellinen valmistus ja tuotannon suurempi mittakaava¹ 	<ul style="list-style-type: none"> • Valmistuksen energiankulutus^{1,2} • Homogenointi¹ • Kuitujen vahva taipumus aggregoitua eli liittyä toisiinsa¹ • Monet epästabiileja² 	<ul style="list-style-type: none"> • Paperi- ja kartonkitekollisuuden lisäaine^{1,2} • Elintarviketeollisuus¹ • Komposiitit^{1,2} • Päälysteet¹ • Rakennusmateriaalit¹ • Nanofiltrit¹
CNC	<ul style="list-style-type: none"> • Tutkittu pisimpään ja ominaisuudet tunnetaan hyvin^{1,2} • Kapea partikkelien kokojakauma² • Optiset ominaisuudet² • Kemiallinen puhtaus² • Teollinen tuotanto mahdollista isossa mittakaavassa² • Jäykkyys^{1,2} • Korkea sulamispiste¹ • Raaka-aineiden hyvä saatavuus (puu ja puuvilla)¹ • Suhteellisen ympäristöystävällinen prosessi² 	<ul style="list-style-type: none"> • Jäykkyys^{1,2} • Ei puhdasta selluloosaa (happokäsittely jättää pintaan sulfaatteja)^{1,2} 	<ul style="list-style-type: none"> • Elektroniset näytöt¹ • Turvapaperit¹ • Funktionaaliset elintarviketeolliset ja kaasubarrieripakkaukset¹ • Komposiitit^{1,2} • Filmit ja pinnoitteet¹ • Stabilointiaineet^{1,2}

Pidemmän aikaa tutkitut selluloosananokiteet sekä selluloosananofibrillit päihittävät bakteerinanoselluloosan tuotannon osalta, sillä mittakaavan kasvatus ja hinnan laskeminen ovat vielä työn alla. Toisaalta bakteerinanoselluloosa on lupaava ominaisuuksiensa puolesta ja soveltuu parhaiten muun muassa lääketieteen tarkoituksiin. Kaikkia kolmea tutkitaan edelleen hyvin paljon (Klemm et al. 2018).

VTT:n raportti (Kangas 2014) esitti selluloosananokiteiden valmistukselle enemmän ongelmia kuin taulukossa on mainittu. Esimerkkinä rikkihapon hankala kierrätettävyys ja nanoselluloosan matala saanto. Klemm et al. (2018) artikkelin mukaan rikkihappo on kuitenkin mahdollista kierrättää ja saannot ovat riittäviä kaupalliseen toimintaan. Tästä voidaan päätellä valmistusmenetelmien kehittyvän suhteellisen nopeasti, kun tutkimus pyrkii jatkuvasti ratkaisemaan ilmenneitä ongelmia. Bakteerinanoselluloosan tuottomäärien kasvattamiseksi tehdään tutkimusta muun muassa bioreaktoreihin liittyen, jotta tuottomäärät saataisiin vastaamaan markkinapotentiaalia (Klemm et al. 2018).

3. BAKTEERINANOSELLULOOSAN TUOTTAMINEN

Bakteerit tuottavat nanoselluloosaa nesteviljelmässä solujen ulkopuolelle. Nesteen pintaan muodostuu nanoselluloosasta hydrogeeli (Klemm et al. 2018). Hydrogeeli koostuu hyvin ohuiden selluloosakuitujen muodostamasta kolmiulotteisesta verkostosta, joka voi sisältää jopa 99 % vettä (Heinze 2015; Dufresne 2017). Hydrogeelistä saadaan muokattua filmimäinen materiaali erilaisilla kuivausmenetelmillä.

3.1 Tuotannon tilanne nykyään

Bakteerinanoselluloosaa on tuotettu pitkään Nata de Coco -farmeilla Aasiassa, missä siitä valmistetaan samannimistä jälkiruokaa. Farmien tuotantokapasiteetti on noin 500–1500 tonnia vuodessa tuottajaa kohti, mutta tuotantoon liittyy vielä useita käsin tehtäviä työvaiheita. (Klemm et al. 2018) Materiaalin tuottaminen kaupallisesti kannattavassa mittakaavassa muihinkin sovelluksiin on yksi sen suurimmista tämänhetkisistä haasteista.

Bakteerinanoselluloosan tuottamisen teollistamiseen pyritään jatkuvasti kehittämällä erilaisia viljelymenetelmiä ja tuotantoteknisiä ratkaisuja sekä muokkaamalla selluloosasynteessin metaboliareittiä synteettisen biologian keinoin. Tuotannon mittakaavan kasvattamisen lisäksi tärkeää on prosessin optimointi, saannon kasvattaminen sekä tuotannon kulujen vähentäminen.

Tuotannon kehittyessä ilmenee jonkin verran myös uusia ongelmia. Perinteisen laboratoriomittakaavassa, sekä Nata de Cocon tuotannossa, käytetyn staattisen viljelmän rinnalle kehitettyjä ravisteluviljelmiä sekä bioreaktoreita tutkittaessa on ilmennyt muun muassa tiettyjen materiaaliominaisuuksien huonontuminen (Choi et al. 2009; Wu & Li 2015). Eri viljelymetodeista johtuvat eroavaisuudet tuottavat toisaalta myös eri sovelluksiin paremmin soveltuvaa bakteerinanoselluloosaa (Wang et al. 2019). Materiaalin ominaisuuksiin vaikuttavat viljelymenetelmän lisäksi muun muassa sen tuotannossa käytetyt raaka-aineet sekä jatkojalostus. Tuotannossa tulee myös huomioida elävien solutehtaiden käytön tuomat haasteet, kuten mahdolliset epäsuotuisat mutaatiot, bakteerien muun aineenvaihdunnan tuotteet sekä solujen kasvulle suotuisien viljelyolosuhteiden ylläpitäminen. Kaikki nämä voivat osaltaan vaikuttaa nanoselluloosan tuottamiseen.

3.2 Raaka-aineet ja viljelymenetelmät

Bakteerinoselluloosan pääasiallisia raaka-aineita ovat sakkaridit (Iguchi et al. 2000). Yleensä viljelyssä käytetään Hestrin-Schramm mediumia eli H-S mediumia, joka sisältää glukoosia hiilenlähteenä sekä ravinteita ja puskuriyhdisteitä (Klemm et al. 2021). Viljelyprosessia voidaan pyrkiä optimoimaan erinäisten lisäaineiden avulla, mutta ne voivat myös vaikuttaa lopullisen tuotteen rakenteeseen ja muihin ominaisuuksiin (Wang et al. 2019). Raaka-aineet voidaan toisaalta valita myös tuotespesifisesti. Esimerkiksi Nata de Cocon tuotannossa mediumina toimii perinteisesti kookosvesi (Fan et al. 2011).

Prosessin raaka-aineena on lisäksi tutkittu maatalous- ja teollisuusjätettä. Tämän tavoitteena on tuotannon kustannusten pienentäminen. (Wang et al. 2019; Hussain et al. 2019) Jätteen hyödyntäminen uusiksi tuotteiksi on myös kiertotaloutta tukeva ratkaisu. Esimerkiksi Song et al. (2009) totesi tutkimuksessaan elintarvikejätteen hyvin tehokkaaksi mediumiksi bakteerinoselluloosan massatuotantoa varten. Toisessa tutkimuksessa Tsouko et al. (2015) käytti bakteerien pääasiallisena ravinteiden lähteenä biodieselintuotannon jäte- ja sivuvirtoja. Lisää esimerkkejä tutkituista jätevirroista on koottu Hussain et al. (2019) artikkelissa. Yleisesti ottaen raaka-aineeksi soveltuvat runsaasti erilaisia sokereita sisältävät materiaalivirrat. Bakteerit pystyvät hyödyntämään muun muassa glukoosia, sakkaroosia ja mannitolia (Wang et al. 2018; Hussain et al. 2019). Medium voidaan valmistaa myös hajottamalla polysakkarideja ensin entsyymaattisesti. Tätä hyödynnetään esimerkiksi riisin kuorien muokkaamisessa mediumiin sopivaksi. Monet jätevirrat sisältävät hiilenlähteenä toimivien sokereiden lisäksi myös bakteerien tarvitsemat ravinteet, vitamiinit ja proteiinit eikä niihin tarvitse lisätä mitään. Tiedetyt jätevirrat saattavat kuitenkin vaatia jonkinlaista esikäsittelyä ennen käyttöä. (Hussain et al. 2019)

Eri jätevirtoja hyödyntäen tuotetun bakteerinoselluloosan fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet eivät juurikaan eroa standardi mediuumeilla tuotetusta. Lisäksi jättemateriaaleja hyödyntävillä menetelmillä päästään monesti korkeampiin saantoihin. (Hussain et al. 2019) Tämä saattaa johtua esimerkiksi mediumin kompleksisuudesta ja monipuolisuudesta. Toisaalta tiettyjen jätevirtojen monipuolisuus voi vaikeuttaa jätteen karakterisointia ja sen sisältö saattaa vaihdella. Korkean saannon lisäksi jätteiden saatavuus suurissa määrissä mahdollistaa bakteerinoselluloosan tuotannon kaupallisessa mittakaavassa. Toisaalta tämän mittakaavan saavuttaminen vaatii ensin teollisuuden ja tutkijoiden välistä yhteistyötä toteutuksen suunnittelussa. Kannustimena tähän toimii muun muassa jätteiden hävityksen kustannusten pieneminen. (Hussain et al. 2019)

Nanoselluloosan tuottamista bakteereilla on tutkittu noin 15 vuotta (Klemm et al. 2021). Perinteisen staattisen viljelmän rinnalle on tutkimuksen myötä kehitetty erilaisia ravisteluviljelmiä sekä bioreaktoreita. Näiden tavoitteena on muun muassa tuotannon mittakaavan kasvattaminen laboratorion kokoluokasta massatuotantoon.

3.2.1 Staattinen viljelmä

Staattisella viljelmällä tarkoitetaan bakteerinanoselluloosan tuottamista säiliössä, joka sisältää ravinneliuoksen sekä bakteerit. Seosta inkuboidaan päivästä kahteen viikkoon 28–30 celsiusasteessa. Liuoksen pH:n tulee olla välillä 4–7. Menetelmä tuottaa hydrogeelikalvon nesteen ja kaasun rajapintaan. Kalvon paksuus kasvaa viljelyajan myötä, mutta nanoselluloosan määrän lisääntyminen vaikeuttaa myös bakteerien hapensaantia. Tätä ei siis voida hyödyntää jatkuvassa tuotannossa. Lisäksi nanoselluloosan saantoon vaikuttaa rajoittavasti viljelyastian pinta-ala. Staattisen viljelymenetelmän tuloksena syntyvällä bakteerinanoselluloosalla on kuitenkin erinomainen rakenne ja ominaisuudet. Staattisen viljelmän suurimmat ongelmat ovat sen korkeat kustannukset sekä matala saanto. (Wang et al. 2019)

Perinteisen staattisen viljelmän rinnalle on kehitetty myös uusi bioreaktoria muistuttava tekniikka nimeltä Mobile Matrix Reservoir Technology tai lyhyesti MMR Tech. Tekniikka perustuu nesteviljelmään säännöllisesti upotettavaan muottiin, johon bakteerit tuottavat nanoselluloosaa kerroksittain. MMR Tech:in tärkein sovelluskohde on tällä hetkellä lääketieteelliset implantit, joilla on tietyt vaatimukset materiaalin muodolle. Tämä tekniikka on kuitenkin vielä suhteellisen kallis ja hidas eikä siksi sovellu massatuotantoon. (Klemm et al. 2021)

Staattisessa viljelmässä tuotetun bakteerinanoselluloosan tyypillisiä käyttökohteita ovat kudosteknologian sovellukset sekä elintarvikkeet ja kosmetiikka. Sitä voidaan hyödyntää myös paperiteollisuudessa. (Wang et al. 2019)

3.2.2 Ravisteluviljelmä

Ravisteluviljelmän (engl. agitated/shaking culture) tarkoitus on edistää bakteerien hapensaantia nanoselluloosan määrän kasvaessa, mikä oli todettu ongelmaksi staattisessa viljelmässä. Hapensaanti on tärkeää aerobisten bakteerien kasvun kannalta. Tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että ravisteluviljelmän saannot ovat samaa luokkaa kuin staattisessa viljelmässä. (Wang et al. 2019) Tämän syyksi osoittautui bakteerien geneettinen epästabilius ravisteluviljelmässä, minkä tuloksena syntyy selluloosaa tuottamattomia mutanteja (Chawla et al. 2009; Wang et al. 2019; Hur et al. 2020). Ravisteluviljelmä ei myöskään sovellu kaikille bakteerikannoille (Hu et al. 2013).

Ravisteluviljelmän avulla tuotettu bakteerinanoselluloosa eroaa staattisessa viljelmässä tuotetusta myös rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan. Tällä menetelmällä tuotettu nanoselluloosa on huonompaa mekaanisilta ominaisuuksiltaan, ja sillä on matalampi polymeerisaatioaste sekä kiteisyys. Ominaisuuksiin vaikuttaa viljelmän sekoituksen nopeus: alle 100 rpm nopeudella nanoselluloosan muoto on epäsäännöllinen, mutta reilun 125 rpm nopeudella syntyy pallomaisia (engl. spherical) nanoselluloosapartikkeleita. (Wang et al. 2019) Tätä suuremmilla nopeuksilla syntyvän nanoselluloosan muoto muuttuu eikä nopeuden lisääminen kasvata tuottomääriä (Hu et al. 2013; Wang et al. 2019).

Staattisen viljelmän tavoin tämäkin menetelmä on kallis ja tuottavuudeltaan samaa luokkaa selluloosaa tuottamattoman mutantin takia. Menetelmän ongelmista huolimatta on myös tutkimusta, jonka mukaan ravisteltuviljelämä voisi olla sopivin menetelmä bakteerinanoselluloosan tuottamiseen taloudellisessa mittakaavassa (Hu et al. 2013). Erilaiset ominaisuudet soveltuvat myös erilaisiin sovelluksiin. Ravisteluviljelmässä tuotetun nanoselluloosan tyypillisiä käyttökohteita ovat lääkettä luovuttavat polymeerit, lipaasien immobilisaatio sekä adsorbentit (Wang et al. 2019).

3.2.3 Bioreaktorit

Bioreaktoreita on kehitetty useita erityyppisiä ja ne voidaankin jaotella useampaan alaluokkaan. Bioreaktorin tarkoitus on ylläpitää prosessille suotuisia olosuhteita esimerkiksi syöttämällä säiliöön happea ja ravinteita sekä sekoittamalla liuosta. Bioreaktoreiden tavoitteena on prosessin jatkuvuus ja teollisen tuotannon mahdollistaminen lyhentämällä viljelyaikaa sekä kasvattamalla tuottavuutta ja prosessin mittakaavaa (Wang et al. 2019). Prosessin automatisointi on myös tärkeä tekijä. Bakteerinanoselluloosan tuottamiseen käytetään muun muassa air-lift reaktoreita, kiertokiekkoreaktoreita (engl. rotating disc reactor) sekä muunneltuja staattisia reaktoreita (engl. modified static reactor) (Wang et al. 2019).

Air-lift bioreaktorin tarkoitus on edesauttaa bakteerien hapensaantia. Tekniikka on kehittynyt alkuperäisistä, energiaa vievistä, sekoitetuista viljelyastioista erityyppisiin muokattuihin air-lift reaktoreihin ja kuplakolonnireaktoreihin (engl. bubble column reactor) (Wang et al. 2019). Tämän tyyppisten reaktoreiden peruseriaate on viljelmän sekoitus ja hapen lisääminen paineistetun kaasun avulla. Erityisesti kuplakolonnireaktorit on osoitettu tehokkaiksi massatuotantoa varten (Choi et al. 2009). Air-lift reaktoreiden etuna sekoitettuun viljelyastiian verrattuna on myös bakteerisoluihin kohdistuvan leikkausjännityksen (engl. shear stress) väheneminen (Wu & Li 2015).

Kiertokiekkoreaktori on air-lift reaktorien tavoin myös mediumia sekoittava bioreaktori. Sen erikoisuutena on mahdollisuus lisätä kasvatuliukseen erilaisia kiinteitä aineita ja

kuituja, joiden tarkoituksena on parantaa nanoselluloosan ja siihen perustuvien komposiittien ominaisuuksia. Tällaisissa reaktoreissa saanto ei kuitenkaan ole merkittävästi suurempi kuin staattisessa viljelmässä. Kiertokiekkoreaktoreita on kuitenkin kehitetty paremmiksi muun muassa vaihtamalla kiekkojen materiaali muovikomposiittiin. Tällainen PCS-RDB (engl. plastic composites supporting rotating disc bioreactor) reaktori mahdollistaa kiekkojen upottamisen nesteviljelmän pinnan alle, sillä muovi tarjoaa bakteereille tarttumapinnan. Tämä parantaa menetelmän saantoa ja mahdollistaa puolijatkuvan tuotannon. (Wang et al. 2019) PCS-RDB:n mittakaavaa on myös helppo kasvattaa kaupallisten tuotteiden tarpeisiin (Lin et al. 2014). Menetelmän tuottavuutta on tutkittu myös lisäaineiden kanssa onnistuneesti. Toisaalta lisäaineet vaikuttavat materiaalin ominaisuuksiin. (Lin et al. 2016)

Näiden eri tavoin sekoitettujen reaktoreiden lisäksi on kehitetty myös muokattuja staattisia reaktoreita. Niiden pääasiallinen tarkoitus on tuottaa nanoselluloosaa, jonka rakenne ja ominaisuudet vastaavat paremmin staattisessa viljelmässä tuotettua nanoselluloosaa. Näissä reaktoreissa keskitytään myös suuren happipitoisuuden ylläpitämiseen viljelmässä. (Wang et al. 2019) Yksi esimerkki tällaisesta reaktorista on jo staattisen viljelmän yhteydessä esitelty MMR Tech. Bakteerinanoselluloosan tuottamisessa on käytetty lisäksi triklekerrosreaktoria (engl. trickling bed reactor), jota hyödynnetään myös etikan tuotannossa. Tämä menetelmä tuottaa ominaisuuksiltaan erinomaista bakteerinanoselluloosaa paremmalla tuottavuudella kuin staattinen viljelmä. (Lu & Jiang 2014)

Yleisimpien bioreaktoreiden lisäksi on kehitetty ja kehitetään edelleen myös lukuisia muita bioreaktoreita, joiden tavoitteena on muun muassa parantaa tuottavuutta tai puutua muissa malleissa ilmeneviin ongelmiin. Tällä hetkellä ei ole olemassa yhtä reaktoriyyppiä tai viljelymenetelmää, jota voitaisiin pitää muita huomattavasti parempana. Toisaalta eri sovellusten vaatimuksiin pystytään vastaamaan paremmin eri menetelmiä hyödyntämällä. Eri viljelymenetelmien tuottonopeuksia on vertailtu taulukossa 2. Arvot perustuvat yksittäisten tutkimusten raportoimiin tuloksiin.

Taulukko 2. Eri viljelymenetelmien tuottonopeuksia. Massat on esitetty kuivapainona.

Viljelymenetelmä	Tuottonopeus (g/l/h)	Lähde
Staattinen viljelmä	0,017	Czaja et al. 2004
Ravisteluviljelmä	0,014	Czaja et al. 2004
Air-lift reaktori	0,22	Chao et al. 2001
Kuplakolonnireaktori	0,078–0,094	Choi et al. 2009
PCS-RDB	0,01	Lin et al. 2014

Taulukkoa tarkastellessa tulee huomioida, ettei suurempi arvo automaattisesti tarkoita parempaa menetelmää, vaan menetelmien soveltuvuuteen vaikuttavat myös tuotettavan nanoselluloosan ominaisuudet. Lisäksi on tärkeää ottaa huomioon, kuinka pitkään bakteerit pystyvät ylläpitämään taulukossa ilmoitettua tuotantotahtia. Myös prosessin kokoluokka ja jatkuvuus on tärkeää huomioida. Kaikille työssä mainituille menetelmille ei löytynyt vertailukelpoista arvoa.

3.3 Biosynteesi

Nanoselluloosan biosynteesi tapahtuu bakteerien solukalvolla selluloosasyntaasin avulla. Solun ulkopuolella selluloosaketjut aggregoituvat muodostaen nauhamaista nanoselluloosaa, joka on edelleen kiinni bakteereissa. Muodostuu siis nanoselluloosaverkosto, jonka lomaan jäävät sen tuottamisessa käytetyt bakteerisolut. Solut ja mediumin jäännökset voidaan poistaa nanoselluloosasta viljelyn lopuksi sopivalla puhdistusmenetelmällä. (Dufresne 2017) Bakteerit tuottavat suurimman osan selluloosasta kasvuvaiheessa eli log-vaiheessa sekä muuttumattoman kasvun vaiheessa (Wang et al. 2019).

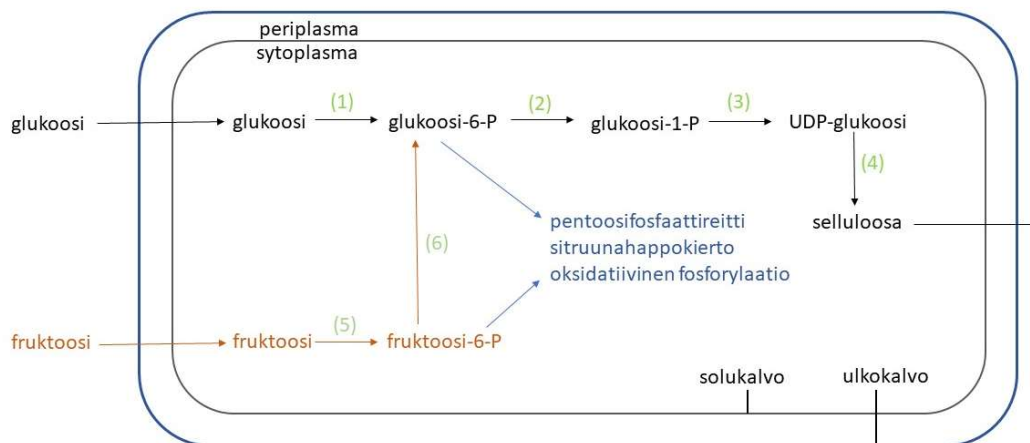
Monet bakteerit tuottavat selluloosaa luonnostaan erityisen aineenvaihduntareitin avulla. Materiaaliominaisuuksien ja huomattavan tuottomäärän perusteella bakteerinanoselluloosan tuottamiseen käytetään yleensä *Acetobacteraceae* perheeseen kuuluvia *Glucanacetobacter* ja *Komagataeibacter* suvun bakteereita (Gilbert & Ellis 2019; Singh et al. 2020). *Acetobacteraceae* tunnetaan myös nimellä etikkahappobakteerit (AAB, engl. acetic acid bacteria), koska ne hapettavat hiiliyhdisteitä ja etanolia etikaksi (Yamada & Yukphan 2008). Ne ovat gram-negatiivisia aerobeja (Singh et al. 2020). Niitä käytetään teollisuudessa muun muassa fermentoitujen ruokien ja juomien, kuten kombuchan, valmistuksessa (De Roos & De Vuyst 2018).

G. xylinum pystyy polymerisoimaan 108 glukoosiyksikköä selluloosaksi tunnissa ja sen avulla saavutetaan korkein nanoselluloosan tuottomäärä (Wang et al. 2019). Se kykenee myös hyödyntämään monia erilaisia hiilen ja typen lähteitä (Lee et al. 2014). *Komagataeibacter* kantoja on käytetty paljon tutkimuksissa, joissa bakteereita on muokattu synteettisen biologian avulla (Singh et al. 2020). Esimerkiksi *K. rhaeticus* bakteerikantojen muokkaamista varten on kehitetty synteettisen biologian työkaluja, joiden on osoitettu toimivan myös *K. xylinus* sekä *K. hansenii* kannoilla (Florea et al. 2016; Teh et al. 2019; Singh et al. 2020).

3.3.1 Aineenvaihduntareitti

Bakteerinanoselluloosaa syntyy solutehtaiden aineenvaihdunnan eli metabolian tuotteena. Selluloosan biosynteesiä ei vielä täysin ymmärretä, mutta sen molekyyllitason yksityiskohtiin kohdistuu paljon tutkimusta (Gilbert & Ellis 2019; Jacek et al. 2019). Selluloosan synteesireitin lisäksi bakteerisolussa tapahtuu samanaikaisesti myös muu elävän solun kasvuun ja toimintaan liittyvä aineenvaihdunta. Glukoosi voidaan ohjata esimerkiksi myös pentoosifosfaattireitille tai sitruunahappokiertoon (Lee et al. 2014). *Komagataeibacter* ja *Gluconacetobacter* sukujen bakteerit eivät kykene EMP-tyyppiseen (Embden-Meyerhof-Parnas) glykolyysiin, koska niiltä puuttuu fosfofruktokinaasi entsyymi (Lee et al. 2014; Gwon et al. 2019; Singh et al. 2020).

Yksinkertaisin reitti on tuottaa selluloosaa glukoosista (kuva 2). Bakteerin hiilenlähde kuitenkin vaikuttaa metaboliareittiin (Wang et al. 2018). Muiden hiilenlähteiden käyttö edellyttää yhdisteiden muokkausta glukoosille esitetyn reitin välituotteiksi. Yhdisteiden muokkaus voi kuitenkin vaikuttaa selluloosan saantoon. Wang et al. (2018) tutkimuksen mukaan fruktoosi tuottaa korkeimman saannon. Kuvassa 2 on esitetty metaboliareitti myös fruktoosille.



Kuva 2. Selluloosan synteesi glukoosista ja fruktoosista *Komagataeibacter* ja *Gluconacetobacter* suvun bakteereissa (Perustuu lähteisiin Lee et al. 2014; Wang et al. 2018; Anton-Sales et al. 2019; Jacek et al. 2019). Glukoosi sidotaan soluun glukoosi-6-fosfaattiksi ja muutetaan vaiheiden kautta UDP-glukoosiksi (uridiinidifosfaattiglukoosi). Lopulta UDP irrotetaan ja glukoosi polymerisoidaan selluloosaksi. Valmis bakteerinanoselluloosa erittyy ulos solusta. Reaktioita katalysoivat entsyymit on merkitty kuvaan numeroin: (1) glukokinaasi, (2) fosfoglukomutaasi, (3) UGPaasi (UDP-glukoosipyrofosforylaasi), (4) selluloosasyntaasi, (5) fruktokinaasi, (6) fosfoglukoisomeraasi. Selluloosasyntaasia aktivoi c-di-GMP eli syklinen-di-guanosiinimonofosfaatti.

Bakteerinoselluloosan synteisiin tarvitaan useita entsyymejä, katalyyttisiä komplekseja sekä säätelyproteiineja (Lee et al. 2014; Jacek et al. 2019). Synteesi koostuu neljävaiheisesta 1,4- β -glukaaniketjun muodostumisesta (kuva 2) sekä ketjujen kokoamisesta kuiduiksi ja edelleen fibrilleiksi. Kokoaminen on bakteerinoselluloosan muodostumisnopeutta rajoittava vaihe. Biosynteesi alkaa glukoosin fosforylaatiolla ja isomerisaatiolla. Seuraavaksi muodostuu UDP-glukoosi (uridiinidifosfaattiglukoosi), josta poistetaan UDP ennen glukoosin liittämistä selluloosaketjun päähän. Tätä reaktiota katalysoi selluloosasyntaasi. Kun lähtöaineena on glukoosin sijaan fruktoosi, täytyy se fosforylaation jälkeen muokata glukoosi-6-fosfaatiksi. Mikäli monosakkaridin sijaan lähtöaineena on disakkaridi, tapahtuu ensimmäisenä sen hydrolyysi monosakkarideiksi. Esimerkiksi sakkaroosi hajotetaan ensin fruktoosiksi ja glukoosiksi. (Lee et al. 2014) Muita tutkittuja hiilenlähteitä ovat glyseroli, laktoosi, mannitoli sekä etanoli ja asetaatti. Näiden vastaavat reitit on kuvattu Wang et al. (2018) artikkelissa. Wang et al. (2018) tutkimuksen mukaan parhaan saannon tuottivat glukoosi, fruktoosi, mannitoli ja glyseroli.

UGPaasi entsyymien oletetaan olevan erityisen tärkeä selluloosan synteesissä, sillä sen aktiivisuus on selluloosaa tuottavissa bakteereissa noin 100-kertainen verrattuna muihin bakteereihin. Toinen tärkeä molekyyli on c-di-GMP (syklinen-di-guanosiinimonofosfaatti), joka säätelee selluloosasyntaasin aktiivisuutta allosteerisesti. Se aktivoi selluloosasyntaasia sitoutumalla reversiibelisti entsyymien yhteydessä olevaan kalvoproteiiniin. Vapaan ja sitoutuneen c-di-GMP:n suhdetta säätelee solun sisäinen kaliumkonsentraatio. (Lee et al. 2014) Bakteerinoselluloosaa tuottavien bakteereiden aineenvaihduntaa ja selluloosan biosynteesin säätelyä on käsitelty vielä yksityiskohtaisemmin Jacek et al. (2019) artikkelissa.

3.3.2 Bakteerien geneettinen muokkaus

Bakteeriselluloosaa tuottavien solutehtaiden saantoa ja tuotteen ominaisuuksia voidaan parantaa tiettyyn pisteeseen asti optimoimalla viljelyolosuhteita. Tähän kuluu kuitenkin aikaa ja vaivaa (Choi et al. 2019). Prosessia voidaan parantaa entisestään hyödyntämällä synteettisen biologian työkaluja. Niiden avulla bakteerisolujen aineenvaihduntareittejä voidaan optimoida ja muuttaa muokkaamalla bakteerien DNA:ta. Bakteerien DNA kattaa kromosomaalisen sekä plasmidien DNA:n. Synteettisen biologian avulla voidaan tuotannon optimoinnin lisäksi vähentää ei-toivottujen mutaatioiden esiintymistä bakteereissa (Singh et al. 2020). Mutaatioita esiintyy kaikissa elävissä organismeissa ja ne voivat vaikuttaa negatiivisesti selluloosan tuotantoon.

Solujen muokkausta voidaan helpottaa entisestään standardoimalla työkaluja ja menetelmiä. Lisäksi tietotekniikan ja tekoälyn avulla voidaan mallintaa muokattavia soluja ja

niiden aineenvaihduntaa sekä helpottaa geneettisen datan käsittelyä (Choi et al. 2019). Synteettisen biologian työkaluja on taulukoitu monipuolisesti Choi et al. (2019) artikkelissa. Erityisesti tässä työssä käsitellyjä bakteereita varten kehitettyjä työkaluja esitellään Florea et al. (2016) ja Teh et al. (2019) artikkeleissa, joista jälkimmäinen on laajennettu versio edeltävän pohjalta.

Yleisesti käytettyjä työkaluja ovat plasmidivektorit sekä CRISPR (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Plasmidien avulla soluihin voidaan tuoda uusia geenejä tai jopa kokonaisia operoneja osana itsenäisesti jakautuvia DNA-renkaita. CRISPR/Cas menetelmän avulla taas voidaan vaikuttaa jo olemassa oleviin geeneihin ja muokata niitä. Tässä työssä keskitytään siihen, miten aiemmin mainittuja bakteereita on muokattu näiden tekniikoiden avulla. Kaikista yksinkertaisin tapa vaikuttaa nanoselluloosan tuottamiseen on bakteerikannan valinta.

Komagataeibacter suvun bakteereissa plasmidivektoria on hyödynnetty esimerkiksi Gwon et al. (2019) tekemässä tutkimuksessa. Ryhmä käytti plasmidia siirtääkseen bakteereihin fosfofruktokinaasia koodaavan geenin. Kun bakteerit alkoivat tuottaa kyseistä entsyymiä, solujen hiilenlähteenä käyttämä glukoosi ohjautui pentoosifosfaattireitin sijaan EMP-glykolyysiin eli glukoosin hajotukseen energiaksi. Solut alkoivat siten tuottaa nelinkertaisen määrän ATP:ta, joka puolestaan inhiboi eli estää glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasin toimintaa. Kyseinen entsyymi katalysoi pentoosifosfaattireitin ensimmäistä vaihetta. Tästä syystä glukoosi-6-fosfaatti ohjataan selluloosan synteeseireitille pentoosifosfaattireitin sijaan.

Huang et al. (2020) käyttivät tutkimuksessaan CRISPR interferenssiä (CRISPRi) vaikuttaakseen *galU* -geenin ilmentymiseen *K. xylinus* -kannassa. Kyseisen geenin todettiin vaikuttavan solujen selluloosan tuotantotahtiin, mikä puolestaan vaikuttaa tuotetun selluloosan kiteisyyteen ja huokoisuuteen. Tekniikkaa voitaisiin siis hyödyntää bakteerinanoselluloosan rakenteen muokkaamisessa.

G. xylinus kantoja on muokattu geneettisesti pyrkien vaikuttamaan UGPaasin sekä c-di-GMP:n määrään soluissa. Ensimmäinen näistä vaikuttaa selluloosan prekursorina toimivan UDP-glukosin muodostumiseen ja toinen aktivoi selluloosasyntaasia. (Lee et al. 2014) Samoja bakteereita on muokattu lisäksi siten, että ketoglukonaatin tuottaminen estyy. Ketoglukonaatti on selluloosan synteessin turha sivutuote ja se alentaa mediumin pH:ta vaikuttaen siten solujen kasvuun ja nanoselluloosan saantoon. (Ullah et al. 2017) Vaikutus saantoon selittyy sillä, että myös ketoglukonaatin lähtöaineena toimii glukoosi (Lee et al. 2014).

Jo olemassa olevien ominaisuuksien muokkauksen lisäksi bakteereita on muokattu tuottamaan aivan uudenlaisia materiaaleja. Esimerkiksi Yadav et al. (2010) muokkasi *G. xylinus* bakteereita tuomalla niihin UDP-GlcNAc:n (UDP-N-asetyyli-glukosamiini) synteesistä vastaavan operonin. Näin solut saatiin tuottamaan kopolymeeriä (engl. copolymer), joka on selluloosan ja kitiinin yhdistelmä. Tällaisella materiaalilla on jälleen uudenlaiset mahdollisuudet erilaisissa sovelluksissa.

Mitä paremmin bakteerien genomia opitaan tuntemaan ja ymmärtämään, sitä tarkemmin soluja pystytään muokkaamaan. Myös käytetyt työkalut ja tekniikat kehittyvät jatkuvasti. Selluloosan biosynteesiin liittyviä genejä, niiden merkitystä ja tehtäviä ovat käsitelleet esimerkiksi Römling ja Galperin (2015) artikkelissaan.

3.4 Materiaalin jatkojalostus

Bakteerinanoselluloosan ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa soluja muokkaamalla sekä viljelyn aikana muun muassa erilaisten lisäaineiden avulla (Dufresne 2017). Näiden lisäksi materiaalia voidaan muokata jälkikäteen erilaisilla käsittelyillä. Näin materiaalin mahdollisten sovellusten kirjo laajenee entisestään.

Nanoselluloosan yleisimpiä muokkausmenetelmiä ovat hydrogeelin kuivaus ja säilyvyyden parantaminen. Kuivausmenetelmiä on monia, esimerkiksi pakastekuivaus heti valmistuksen jälkeen parantaa materiaalin säilyvyyttä. Säilyvyyteen vaikuttaa erityisesti lämpötila. Kuivaus pienentää myös materiaalin tilavuutta, mikä on hyödyllistä kuljetuksen kannalta. (Kangas 2014) Tiettyjä sovelluksia varten on kuitenkin tarpeen saattaa kuivattu materiaali takaisin alkuperäiseen muotoonsa. Uudelleen dispergoinnin mahdollisuus riippuu osittain kuivaustekniikasta (Klemm et al. 2021). Sitä voidaan kuitenkin edesauttaa lisäaineiden ja kemiallisen muokkauksen avulla. Materiaalin säilyvyyteen voidaan vaikuttaa kuivauksen lisäksi biosidien ja UV-käsittelyn avulla. (Kangas 2014)

Bakteerinanoselluloosan ominaisuuksia voidaan muokata kemiallisesti. Kemiallisia menetelmiä on käsitelty laajasti Habibin (2014) artikkelissa. Tässä niistä on käyty läpi vain muutamia esimerkkejä. Materiaalin pintakemian muokkaaminen perustuu sen hydroksyyliyhmiä hyödyntämiseen. Muokkauksia voidaan tehdä ei-kovalenttisesti, jolloin pinta vetää puoleensa surfaktantteja esimerkiksi hydrofiilisyyden tai vetysidosten ansiosta. Hydroksyyliyhmiä voidaan myös muokata karboksyyliyhmiiksi hapettamalla. Lisäksi materiaaliin voidaan liittää erilaisia molekyyliä muun muassa esteröimällä tai eeteröimällä. Esimerkiksi asetyyliyhmiä liittämistä nanoselluloosaan esteröimällä on tutkittu laajasti. (Habibi 2014)

Eri sovelluksiin tähtääviä muokkaustekniikoita ja menetelmiä on myös lukuisia muita. Tutkimusten mukaan bakteerinoselluloosaa voidaan esimerkiksi leikata ja rei'ittää CO₂ laser tekniikalla. Erilaisia bakteerinoselluloosakomposiitteja on kehitetty myös muun muassa biosensorisovelluksiin. (Klemm et al. 2021) Niissä tavallisia toimenpiteitä ovat esimerkiksi reseptorin asemassa toimivien molekyylien liittäminen bakteerinoselluloosaan.

4. BAKTEERINANOSELLULOOSAN SOVELTAMINEN BIOSENSOREISSA

Yksi bakteerinanoselluloosan monista sovelluksista ovat erilaiset biosensorit. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi sensorisolujen kasvualustana tai itse sensorimateriaalina. Nanoselluloosaan perustuvat hybridimateriaalit ovat myös mahdollisia. Tulevaisuudessa bakteerinanoselluloosalla voitaisiin korvata sensoreiden alustana (engl. platform) nykyään käytetty muovi, lasi ja paperi monissa sovelluksissa. (Golmohammadi et al. 2017) Nanoselluloosan edut näihin verrattuna ovat muun muassa biohajoavuus ja halvempi hinta sekä materiaalin joustavuus (Golmohammadi et al. 2017; Mangayil et al. 2017; Yuen et al. 2020).

Nanoselluloosaan perustuvia biosensoreita voidaan käyttää muun muassa lääketieteen diagnostiikassa, ympäristön seurannassa, elintarvikkeiden turvallisuuden toteamisessa, fysikaalisten ja mekaanisten ominaisuuksien havainnoimisessa sekä biokuvantamisessa. Sensoreilla voidaan siis havaita lukuisia erilaisia yhdisteitä, patogeenejä sekä fyysisiä ominaisuuksia kuten painetta. (Golmohammadi et al. 2017) Sovelluksia varten bakteerinanoselluloosaa täytyy usein muokata kemiallisesti. Poikkeuksena tästä on sen käyttö pelkkänä kasvualustana.

Kuten luvussa 3.4 kerrotaan, materiaalia voidaan muokata kemiallisesti usein eri menetelmin hyödyntäen selluloosamolekyylissä olevia hydroksyyli ryhmiä. Materiaalin funktionalisointi tapahtuu liittämällä siihen asiaan kuuluvia molekyylejä. Näin voidaan vaikuttaa materiaalin ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi sähkönjohtavuuteen tai optisiin ominaisuuksiin.

4.1 Biosensoreiden toimintaperiaate

Biosensorit perustuvat spesifisten yhdisteiden sitoutumiseen sensorimateriaalin reseptoreihin, mikä saa aikaan havaittavan vasteen. Todettava analytti on yleensä liuoksessa. (Sadana et al. 2011) Vaste voidaan havaita esimerkiksi värinmuutoksena, sähköisenä vasteena tai fluoresenssina. Biosensorina voidaan käyttää erilaisia molekyylejä, eliöiden osia tai jopa kokonaisia eläviä soluja, jotka reagoivat ympäristöönsä. Soluja käytettäessä vaste syntyy muuten samalla periaatteella kuin pelkkiä molekyylejä käytettäessä, mutta sen syntyyn liittyvät solun aineenvaihdunta ja geenit. Niissä analytti sitoutuu säätelyproteiiniin, joka aktivoi reportterigeenin. Aktivoitu reportterigeeni alkaa tuottaa reportteriproteiinia, joka pystytään havaitsemaan. (Gui et al. 2017)

Biosensoreita voidaan luokitella niissä syntyvän vasteen mukaan. Optisissa sensoreissa vaste voidaan havaita värinmuutoksena, fluoresoivan proteiinin aktivoitumisena, bioluminesenssina tai muiden optisten ominaisuuksien muutoksena. Elektronisissa ja elektrokemiallisissa sensoreissa havainnot perustuvat sähköisiin ominaisuuksiin. (Golmohammadi et al. 2017) Esimerkiksi pietsosähköisissä sensoreissa niihin kohdistuva mekaaninen voima aiheuttaa sähköisen varauksen syntymisen (Rajala et al. 2018; Zhu et al. 2020; Mangayil et al. 2021). Näiden lisäksi sensoreissa voidaan käyttää hyödyksi mitä tahansa mittauslaitteistolla tai silmin havaittavaa ominaisuutta, joka syntyy riittävän spesifin reseptorin avulla.

4.2 Tutkimus ja käyttökohteet

Bakteerinoselluloosan käyttöä erilaisissa biosensoreissa on tutkittu hyvin monialaisten sovellusten kannalta. Sovellusten lisäksi tutkimus kohdistuu sensoreiden ominaisuuksien kehittämiseen. Tärkeitä ominaisuuksia ovat muun muassa sensorin spesifisyys, herkkyys sekä toistettavuus (Golmohammadi et al. 2017). Bakteerinoselluloosaan perustuvien biosensoreiden kehitys ei ole vielä tuottanut valmiita kaupallisia tuotteita. Zhu et al. (2020) artikkelin mukaan selluloosananomateriaaleihin perustuvia kaupallisia sensoreita voidaan odottaa valmistuvan muutamassa vuosikymmenessä. Tässä työssä käydään läpi esimerkkejä bakteerinoselluloosaan perustuvista biosensoreista, joita on tutkittu viime vuosina. Yhteistä monille tutkituille sovelluksille on materiaalin bioyhteensopiisuuden, joustavuuden ja ympäristöystävällisyyden hyödyntäminen. Optisissa sensoreissa tärkeää on myös bakteerinoselluloosan suhteellisen hyvää läpinäkyvyyttä.

Sriplai ja Pinitsoontorn (2021) kertovat artikkelissaan magneettisten bakteerioselluloosakomposiittien valmistuksesta ja soveltamisesta. Komposiitit valmistetaan liittämällä nanoselluloosaan magneettisia partikkeleita. Tällaisia komposiitteja ovat käyttäneet tutkimuksessaan esimerkiksi Sábio et al. (2019), jotka lisäsivät bakteerinoselluloosaan kobolttiheksasyanoferraatti nanopartikkeleita. Tätä materiaalia voitaisiin käyttää muun muassa elektrokemiallisissa biosensoreissa. Elektrokemiallisia biosensoreita ovat tutkineet myös Gomes et al. (2020). He kiinnittivät bakteerinoselluloosan pintaan laktaattioksidaasi entsyymiä luoden biosensorin, jonka avulla voitiin todeta laktaatti keinotekoisesta hiestä. Laktaattisensori oli vain yksi esimerkki kaikista mahdollisista samantyyppisistä terveydenhuollon sensoreista. Esimerkiksi Silva et al. (2020) ovat tutkineet samantyyppistä biosensoria, jolla voidaan havaita hiestä metalli-ioneita ja biomarkkereita.

Bakteerinoselluloosaa on tutkittu myös pietsosähköisten sensorien raaka-aineena (Mangayil et al. 2017; Sriplai et al. 2020; Mangayil et al. 2021). Sillä pyritään korvaamaan

sensoreissa nykyisin käytetyt, vähemmän ympäristöystävälliset, lyijyä sisältävät keraamit sekä fluoripolymeerit. Näitä sensoreita voidaan hyödyntää muun muassa mekaanisten ärsykkeiden havaitsemisessa (Rajala et al. 2018). Bakterinanoselluloosan piezosähköisiä ominaisuuksia voidaan parantaa lisäämällä siihen mangaaniferriitti nanopartikkeleita (Sriplai et al. 2020).

Muita esimerkkejä bakterinanoselluloosan soveltamisesta biosensoreissa ovat lääketieteelliset elektroniset sensorit, joissa nanoselluloosalevyllä on printattu virtapiiri (Yuen et al. 2020), ja yksinkertaiset optiset sensorit kuten Naghdi et al. (2019) kehittämä kurkumiinista ja bakterinanoselluloosasta koostuva nanopaperi, joka osoittaa albumiinin veriplasmasta värinmuutoksella.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Bakteerinanoselluloosa on hyvin mielenkiintoinen tulevaisuuden materiaali. Sen aktiivinen tutkimus on jatkunut tähän mennessä noin 15 vuotta. Bakteerinanoselluloosan etuna ovat sen erityiset materiaaliominaisuudet, joissa selluloosan ominaisuudet yhdistyvät nanomateriaalien tuomiin mahdollisuuksiin. Sen bioyhteensopivuus tekee siitä mielenkiintoisen materiaalin esimerkiksi lääketieteen sovelluksissa. Lisäksi materiaalin biohajoavuus tukee kestäväen kehityksen ajatustapaa. Bakteerinanoselluloosan valmistusprosessissa on myös pyritty kohti kiertotaloudellista ajattelua tutkimalla erilaisten teollisuuden jäte- ja sivuvirtojen hyödyntämistä synteessin raaka-aineena. Tällä pyritään myös pienentämään prosessin kustannuksia.

Bakteerinanoselluloosan tuottamisen teollistamista on tutkittu paljon. Erityyppisiin bioreaktoreihin kohdistunut tutkimus onkin osoittanut massatuotannon mahdolliseksi useiden tekniikoiden avulla. Viljelymenetelmien lisäksi tuottavuutta parannellaan bakteerisolujen tasolla hyödyntäen synteettistä biologiaa. Useille *Komagataeibacter* suvun bakteereille on kehitetty bakteerinanoselluloosan tuottoa parantavia geneettisen muokkauksen työkaluja. Myös bakteerinanoselluloosan biosynteessireittiä ja bakteerien muuta metaboliaa tutkitaan jatkuvasti sekä molekulaarisella että geneettisellä tasolla.

Bakteerinanoselluloosan tuottamiseen kohdistuvan tutkimuksen lisäksi paljon huomiota saavat materiaalin monialaiset sovellukset. Bakteerinanoselluloosalla on laajat mahdollisuudet muun muassa kudosteknologiassa, elintarvikkeissa ja kosmetiikassa. Tulevaisuudessa sovellusten voidaan olettaa kehittyvän yhä monimutkaisempiin tekniikoihin. Paljon näyttöä on esimerkiksi sen käytöstä erityyppisissä biosensoreissa. Sensoreissa bakteerinanoselluloosaa hyödynnetään esimerkiksi biosensorisolujen kasvualustana tai materiaalin pintakemiaa muokkaamalla itse sensorimateriaalina. Sovellusmahdollisuudet kattavat muun muassa terveys- ja ympäristötekniikkaa. Bakteerinanoselluloosaa on tutkittu sekä nykyisissä sensoreissa käytettyjen materiaalien korvaajana että aivan uudenslaisissa sensoreissa, joiden kehityksen se materiaalina mahdollistaa. Bakteerinanoselluloosaan perustuvien biosensoreiden kaupallistamista voidaan odottaa tulevien vuosikymmenten aikana. Siihen perustuvien kaupallisten tuotteiden yleistymisen vaatii kuitenkin toistaiseksi lisää kehitystä tuotannon mittakaavan ja hinnan osalta.

LÄHTEET

- Anton-Sales, Irene, Uwe Beekmann, Anna Laromaine, Anna Roig, and Dana Kralisch. 2019. "Opportunities of Bacterial Cellulose to Treat Epithelial Tissues." *Current Drug Targets* 20 (8): 808-822. doi:10.2174/1389450120666181129092144.
- Chao, Y., Y. Sugano, and M. Shoda. 2001. "Bacterial Cellulose Production Under Oxygen-Enriched Air at Different Fructose Concentrations in a 50-Liter, Internal-Loop Airlift Reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (6): 673-679. doi:10.1007/s002530000503.
- Chawla, Prashant R., Ishwar B. Bajaj, Shrikant A. Survase, and Rekha S. Singhal. 2009. "Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications." *Food Technology and Biotechnology* 47 (2): 107-124.
- Choi, Chang Nam, Hyo Jeong Song, Myong Jun Kim, Mi Hwa Chang, and Seong Jun Kim. 2009. "Properties of Bacterial Cellulose Produced in a Pilot-Scale Spherical Type Bubble Column Bioreactor." *The Korean Journal of Chemical Engineering* 26 (1): 136-140. doi:10.1007/s11814-009-0021-1.
- Choi, Kyeong Rok, Woo Dae Jang, Dongsoo Yang, Jae Sung Cho, Dahyeon Park, and Sang Yup Lee. 2019. "Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering." *Trends in Biotechnology (Regular Ed.)* 37 (8): 817-837. doi:10.1016/j.tibtech.2019.01.003.
- Czaja, Wojciech, Dwight Romanovicz, and R. Malcolm Brown. 2004. "Structural Investigations of Microbial Cellulose Produced in Stationary and Agitated Culture." *Cellulose* 11 (3): 403-411. doi:10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61.
- Dai, Zhongde, Vegar Ottesen, Jing Deng, Ragne M. Lilleby Helberg, and Liyuan Deng. 2019. "A Brief Review of Nanocellulose Based Hybrid Membranes for CO₂ Separation." *Fibers* 7 (5): 40. doi:10.3390/fib7050040.
- De Roos, Jonas and Luc De Vuyst. 2018. "Acetic Acid Bacteria in Fermented Foods and Beverages." *Current Opinion in Biotechnology* 49: 115-119. doi:10.1016/j.copbio.2017.08.007.
- Dufresne, Alain. 2017. "*Bacterial nanocellulose*". *Nanocellulose : From Nature to High Performance Tailored Materials*. De Gruyter, Inc.. Accessed 5.4.2021. ProQuest Ebook Central.
- Fan, Huiping, Yonghui Wu, Xiaosong Hu, Jihong Wu, and Xiaojun Liao. 2011. "Characteristics of Thin-layer Drying and Rehydration of Nata De Coco." *International Journal of Food Science & Technology* 46 (7): 1438-1444. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02642.x.
- Florea, Michael, Henrik Hagemann, Gabriella Santosa, James Abbott, Chris N. Micklem, Xenia Spencer-Milnes, Laura de Arroyo Garcia, Despoina Paschou, Christopher Lazenbatt, Deze Kong, Haroon Chughtai, Kristen Jensen, Paul S. Freemont, Richard Kitney, Benjamin Reeve, and Tom Ellis. 2016. "Engineering Control of Bacterial Cellulose Production using a Genetic Toolkit and a New Cellulose-Producing Strain." *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 113 (24): E3431-E3440. doi:10.1073/pnas.1522985113.

- Gilbert, Charlie and Tom Ellis. 2019. "Biological Engineered Living Materials: Growing Functional Materials with Genetically Programmable Properties." *ACS Synthetic Biology* 8 (1): 1-15. doi:10.1021/acssynbio.8b00423.
- Golmohammadi, Hamed, Eden Morales-Narváez, Tina Naghdi, and Arben Merkoçi. 2017. "Nanocellulose in Sensing and Biosensing." *Chemistry of Materials* 29 (13): 5426-5446. doi:10.1021/acs.chemmater.7b01170.
- Gomes, Nathalia Oezau, Emanuel Carrilho, Sergio Antonio Spinola Machado, and Livia Florio Sgobbi. 2020. "Bacterial Cellulose-Based Electrochemical Sensing Platform: A Smart Material for Miniaturized Biosensors." *Electrochimica Acta* 349: 136341. doi:10.1016/j.electacta.2020.136341.
- Gui, Qingyuan, Tom Lawson, Suyan Shan, Lu Yan, and Yong Liu. 2017. "The Application of Whole Cell-Based Biosensors for use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics." *Sensors* 17 (7): 1623. doi:10.3390/s17071623.
- Gwon, Hyeokjo, Kitae Park, Soon-Chun Chung, Ryoung-Hee Kim, Jin Kyu Kang, Sang Min Ji, Nag-Jong Kim, et al. 2019. "A Safe and Sustainable Bacterial Cellulose Nanofiber Separator for Lithium Rechargeable Batteries." *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 116 (39): 19288-19293. doi:10.1073/pnas.1905527116.
- Habibi, Youssef. 2014. "Key Advances in the Chemical Modification of Nanocelluloses." *Chemical Society Reviews* 43 (5): 1519-1542. doi:10.1039/c3cs60204d.
- Harwood, Colin and Anil Wipat. 2013. *Microbial Synthetic Biology*. Elsevier/AP. Accessed 5.4.2021. ProQuest Ebook Central.
- Heinze, Thomas. 2015. "Cellulose: Structure and Properties". *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials. Advances in Polymer Science, vol 271*. Springer International Publishing. doi:10.1007/12_2015_319.
- Hu, Yang, Jeffrey M. Catchmark, and Erwin A. Vogler. 2013. "Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth." *Biomacromolecules* 14 (10): 3444-3452. doi:10.1021/bm400744a.
- Huang, Long-Hui, Qi-Jing Liu, Xue-Wen Sun, Xue-Jing Li, Miao Liu, Shi-Ru Jia, Yan-Yan Xie, and Cheng Zhong. 2020. "Tailoring Bacterial Cellulose Structure through CRISPR Interference-mediated Downregulation of galU in Komagataeibacter Xylinus CGMCC 2955." *Biotechnology and Bioengineering* 117 (7): 2165-2176. doi:10.1002/bit.27351.
- Hur, Dong Hoon, Hong-Soon Rhee, Jae Hyung Lee, Woo Yong Shim, Tae Yong Kim, Sang Yup Lee, Jin Hwan Park, and Ki Jun Jeong. 2020. "Enhanced Production of Cellulose in Komagataeibacter Xylinus by Preventing Insertion of IS Element into Cellulose Synthesis Gene." *Biochemical Engineering Journal* 156: 107527. doi:10.1016/j.bej.2020.107527.
- Hussain, Zohaib, Wasim Sajjad, Taous Khan, and Fazli Wahid. 2019. "Production of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes: A Review." *Cellulose* 26 (5): 2895-2911. doi:10.1007/s10570-019-02307-1.
- Iguchi, M., S. Yamanaka, and A. Budhiono. 2000. "Bacterial Cellulose—a Masterpiece of Nature's Arts." *Journal of Materials Science* 35 (2): 261-270. doi:10.1023/A:1004775229149.

- Jacek, Paulina, Fernando Dourado, Miguel Gama, and Stanisław Bielecki. 2019. "Molecular Aspects of Bacterial Nanocellulose Biosynthesis." *Microbial Biotechnology* 12 (4): 633-649. doi:10.1111/1751-7915.13386.
- Kangas, Heli. 2014. *Opas Selluloosananomateriaaleihin*: VTT.
- Klemm, Dieter, Emily D. Cranston, Dagmar Fischer, Miguel Gama, Stephanie A. Kedzior, Dana Kralisch, Friederike Kramer, Tetsuo Kondo, Tom Lindström, Sandor Nietzsche, Katrin Petzold-Welcke, and Falk Rauchfuß. 2018. "Nanocellulose as a Natural Source for Groundbreaking Applications in Materials Science: Today's State." *Materials Today* 21 (7): 720-748. doi:10.1016/j.mattod.2018.02.001.
- Klemm, Dieter, Katrin Petzold-Welcke, Friederike Kramer, Thomas Richter, Vanessa Raddatz, Wolfgang Fried, Sandor Nietzsche, Tom Bellmann, and Dagmar Fischer. 2021. "Biotech Nanocellulose: A Review on Progress in Product Design and Today's State of Technical and Medical Applications." *Carbohydrate Polymers* 254: 117313. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117313.
- Lee, Koon-Yang, Gizem Buldum, Athanasios Mantalaris, and Alexander Bismarck. 2014. "More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites." *Macromolecular Bioscience* 14 (1): 10-32. doi:10.1002/mabi.201300298.
- Lin, Shin-Ping, Shin-Ping Lin, Shu-Chen Hsieh, Shu-Chen Hsieh, Kuan-I Chen, Kuan-I Chen, Ali Demirci, Ali Demirci, Kuan-Chen Cheng, and Kuan-Chen Cheng. 2014. "Semi-Continuous Bacterial Cellulose Production in a Rotating Disk Bioreactor and its Materials Properties Analysis." *Cellulose* 21 (1): 835-844. doi:10.1007/s10570-013-0136-8.
- Lin, Shin-Ping, Chi-Te Liu, Kai-Di Hsu, Yu-Ting Hung, Ting-Yu Shih, and Kuan-Chen Cheng. 2016. "Production of Bacterial Cellulose with various Additives in a PCS Rotating Disk Bioreactor and its Material Property Analysis." *Cellulose* 23 (1): 367-377. doi:10.1007/s10570-015-0855-0.
- Lu, Hongmei and Xiaolin Jiang. 2014. "Structure and Properties of Bacterial Cellulose Produced using a Trickling Bed Reactor." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172 (8): 3844-3861. doi:10.1007/s12010-014-0795-4.
- Mangayil, Rahul, Satu Rajala, Arno Pammo, Essi Sarlin, Jin Luo, Ville Santala, Matti Karp, and Sampo Tuukkanen. 2017. "Engineering and Characterization of Bacterial Nanocellulose Films as Low Cost and Flexible Sensor Material." *ACS Applied Materials & Interfaces* 9 (22): 19048-19056. doi:10.1021/acsami.7b04927.
- Mangayil, Rahul, Antti J. Rissanen, Arno Pammo, Dieval Guizelini, Pauli Losoi, Essi Sarlin, Sampo Tuukkanen, and Ville Santala. 2021. "Characterization of a Novel Bacterial Cellulose Producer for the Production of Eco-Friendly Piezoelectric-Responsive Films from a Minimal Medium Containing Waste Carbon." *Cellulose* 28 (2): 671-689. doi:10.1007/s10570-020-03551-6.
- Naghdi, Tina, Hamed Golmohammadi, Maryam Vosough, Mojgan Atashi, Iman Saeedi, and Mohammad Taghi Maghsoudi. 2019. "Lab-on-Nanopaper: An Optical Sensing Bioplatfrom Based on Curcumin Embedded in Bacterial Nanocellulose as an Albumin Assay Kit." *Analytica Chimica Acta* 1070: 104-111. doi:10.1016/j.aca.2019.04.037.
- Puoskari, Vesa. "Fibdex-Haavasidos Nopeuttaa Paranemista Ja Helpottaa Potilaiden Hoitoa." UPM.fi., accessed 31.1.2021, <https://www.upm.com/fi/artikkelit/innovaatit/20/fibdex-haavasidos-nopeuttaa-paranemista-ja-helpottaa-potilaiden-hoitoa/>.

- Rajala, Satu, Martijn Schouten, Gijs Krijnen, and Sampo Tuukkanen. 2018. "High Bending-Mode Sensitivity of Printed Piezoelectric Poly(Vinylidene fluoride-Co-Trifluoroethylene) Sensors." *ACS Omega* 3 (7): 8067-8073. doi:10.1021/acsomega.8b01185.
- Römling, Ute and Michael Y. Galperin. 2015. "Bacterial Cellulose Biosynthesis: Diversity of Operons, Subunits, Products, and Functions." *Trends in Microbiology (Regular Ed.)* 23 (9): 545-557. doi:10.1016/j.tim.2015.05.005.
- Sábio, Rafael Miguel, Robson Rosa da Silva, Vagner Sargentelli, Junkal Gutierrez, Agnieszka Tercjak, Sidney José Lima Ribeiro, and Hernane da Silva Barud. 2019. "Growth of Magnetic Cobalt Hexacyanoferrate Nanoparticles Onto Bacterial Cellulose Nanofibers." *Journal of Materials Science. Materials in Electronics* 30 (18): 16956-16965. doi:10.1007/s10854-019-02066-6.
- Sadana, Ajit and Neeti Sadana. 2011. *Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics*. 1st ed. Elsevier. Accessed 5.4.2021. <https://app.knovel.com/hot-link/toc/id:kpHBBK0001/handbook-biosensors-biosensor/handbook-biosensors-biosensor>
- Silva, Robson R., Paulo Raymundo-Pereira, Anderson M. Campos, Deivy Wilson, Caio G. Otoni, Hernane S. Barud, Carlos A. R. Costa, Rafael R. Domenegueti, Debora T. Balogh, Sidney J.L. Ribeiro, and Osvaldo N. Oliveira Jr. 2020. "Microbial Nanocellulose Adherent to Human Skin used in Electrochemical Sensors to Detect Metal Ions and Biomarkers in Sweat." *Talanta* 218: 121153. doi:10.1016/j.talanta.2020.121153.
- Singh, Amritpal, Kenneth T. Walker, Rodrigo Ledesma-Amaro, and Tom Ellis. 2020. "Engineering Bacterial Cellulose by Synthetic Biology." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (23): 9185. doi:10.3390/ijms21239185.
- Sriplai, Nipaporn, Rahul Mangayil, Arno Pammo, Ville Santala, Sampo Tuukkanen, and Supree Pinitsoontorn. 2020. "Enhancing Piezoelectric Properties of Bacterial Cellulose Films by Incorporation of MnFe₂O₄ Nanoparticles." *Carbohydrate Polymers* 231: 115730. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115730.
- Sriplai, Nipaporn and Supree Pinitsoontorn. 2021. "Bacterial Cellulose-Based Magnetic Nanocomposites: A Review." *Carbohydrate Polymers* 254: 117228. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117228.
- Teh, Min Yan, Kean Hean Ooi, Shun Xiang Danny Teo, Mohammad Ehsan Bin Mansoor, Wen Zheng Shaun Lim, and Meng How Tan. 2019. "An Expanded Synthetic Biology Toolkit for Gene Expression Control in Acetobacteraceae." *ACS Synthetic Biology* 8 (4): 708-723. doi:10.1021/acssynbio.8b00168.
- Tsouko, Erminda, Constantina Kourmentza, Dimitrios Ladakis, Nikolaos Kopsahelis, Ioanna Mandala, Seraphim Papanikolaou, Fotis Paloukis, Vitor Alves, and Apostolis Koutinas. 2015. "Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 14832-14849. doi:10.3390/ijms160714832.
- Ullah, Muhammad Wajid, Mazhar UI Islam, Shaukat Khan, Nasrullah Shah, and Joong Kon Park. 2017. "Recent Advancements in Bioreactions of Cellular and Cell-Free Systems: A Study of Bacterial Cellulose as a Model." *The Korean Journal of Chemical Engineering* 34 (6): 1591-1599. doi:10.1007/s11814-017-0121-2.

- Wang, Jing, Javad Tavakoli, and Youhong Tang. 2019. "Bacterial Cellulose Production, Properties and Applications with Different Culture Methods – A Review." *Carbohydrate Polymers* 219: 63-76. doi:10.1016/j.carbpol.2019.05.008.
- Wang, Shan-Shan, Yong-He Han, Jia-Lian Chen, Da-Chun Zhang, Xiao-Xia Shi, Yu-Xuan Ye, Deng-Long Chen, and Min Li. 2018. "Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* Sp. W1." *Polymers* 10 (9): 963. doi:10.3390/polym10090963.
- Wu, Sheng-Chi and Meng-Hsun Li. 2015. "Production of Bacterial Cellulose Membranes in a Modified Airlift Bioreactor by *Gluconacetobacter Xylinus*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 120 (4): 444-449. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.02.018.
- Yadav, Vikas, Bruce Paniliatis, Hai Shi, Kyongbum Lee, Peggy Cebe, and David Kaplan. 2010. "Novel in Vivo-Degradable Cellulose-Chitin Copolymer from Metabolically Engineered *Gluconacetobacter Xylinus*." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (9): 6257-6265.
- Yamada, Yuzo and Pattaraporn Yukphan. 2008. "Genera and Species in Acetic Acid Bacteria." *International Journal of Food Microbiology* 125 (1): 15-24. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077.
- Yuen, Jonathan D., Lisa Shriver-Lake, Scott A. Walper, Daniel Zabetakis, Joyce C. Breger, and David A. Stenger. 2020. "Microbial Nanocellulose Printed Circuit Boards for Medical Sensing." *Sensors* 20 (7): 2047. doi:10.3390/s20072047.
- Zhu, Qianqian, Simeng Liu, Jianzhong Sun, Jun Liu, C. J. Kirubakaran, Honglei Chen, Weihua Xu, and Qianqian Wang. 2020. "Stimuli-Responsive Cellulose Nanomaterials for Smart Applications." *Carbohydrate Polymers* 235: 115933. doi:10.1016/j.carbpol.2020.115933.