

FUNDACIÓN DOMINGO MARTINEZ

Ayuda a la Investigación 2015

RESUMEN

INVESTIGADOR PRINCIPAL: M^a Aranzazu Eceiza Mendiguren

TITULO DEL PROYECTO: **Síntesis de nanocelulosas cristalinas obtenidas por vía bacteriana**

En este Proyecto se ha sintetizado con éxito celulosa bacteriana (BC), biopolímero de gran interés actualmente. La biosíntesis se ha realizado mediante métodos sostenibles, a partir de medios de cultivos procedentes del aprovechamiento de residuos agroforestales (residuos de manzanas procedentes de sidrerías del País Vasco) y la bacteria *Gluconacetobacter medellinensis*. Posteriormente, a partir de la celulosa bacteriana se han extraído y aislado nanocelulosas cristalinas.

Se han identificado los genes responsables de la síntesis de celulosa en la cepa ID 13488, mediante estudios *in silico* de la cepa modelo *G. medellinensis* NBRC 3288, cuyo genoma se encuentra accesible en las bases de datos (Número de acceso: APO12159.1). Se han optimizado las condiciones de síntesis de BC utilizando dos tipos de medio cultivo: (1) medio de cultivo estándar Hestrin-Schramm (H-S) y (2) medio de cultivo preparado a partir de residuos de manzana y azúcar de caña (AR). Se ha analizado variables tales como la composición del medio de cultivo, el pH del medio y el tiempo, así como la concentración de oxígeno y el contenido de carbohidratos. Las membranas de BC obtenidas se han caracterizado en cuanto a grado de polimerización, cristalinidad y capacidad de retención de agua, así como mediante técnicas físico-químicas, térmicas, mecánicas y morfológicas. La celulosa presenta la misma estructura química pero la conformación obtenida varía según el medio de cultivo utilizado, lo cual influye en las propiedades que se obtienen como p.e. rendimientos mayores que con el medio de cultivo estándar y además presenta algunas propiedades mejoradas: mayor capacidad de retención de agua, y mayor cristalinidad.

A partir de las membranas de celulosa bacteriana obtenidas, se ha procedido a la extracción de nanocelulosas cristalinas mediante procesos de extracción químicos. Se han utilizado tratamientos ácidos, variando tanto la forma de encontrarse la membrana (seca, húmeda) como el tiempo de tratamiento de la hidrólisis ácida. Se han obtenido nanocelulosas cristalinas con una relación de aspecto (diámetro/longitud) adecuada para su posible utilización como nanorrefuerzo en matrices poliméricas.

Esta Ayuda a la Investigación ha permitido no sólo poner a punto una estrategia de biosíntesis de BC y posterior aislamiento de nanocelulosas cristalinas, sino que también proporcionar un valor añadido a un residuo y contribuir con ello a la sostenibilidad.

TÍTULO: SÍNTESIS DE NANOCELULOSAS CRISTALINAS OBTENIDAS POR VIA BACTERIANA

El objetivo principal de este proyecto ha sido el desarrollo de nuevos métodos y estrategias para la síntesis y preparación de nanocelulosas cristalinas obtenidas a partir de celulosa bacteriana, destinadas a su posible uso en las industrias biomédica, farmacéutica, electrónica y alimentaria, entre otras. Para alcanzar dicho objetivo, la organización jerárquica que presentan algunos materiales presentes en la naturaleza, ha servido de inspiración y punto de partida para el diseño de nuevos materiales mediante síntesis biomimética. Es por ello, que la celulosa se ha sintetizado vía bacteriana, promoviendo métodos de síntesis sostenibles, mediante la utilización de desechos agroforestales. En base a los dos objetivos específicos propuestos en la memoria: 1º desarrollo de formulaciones y tecnologías de biosíntesis que conduzcan con éxito a la obtención de celulosa bacteriana y 2º extracción y caracterización de nanocelulosas cristalinas, las tareas realizadas según la programación establecida y los resultados obtenidos han sido:

TAREA 1. Obtención de celulosa bacteriana a partir de los residuos generados en la elaboración de la sidra (meses 1-6)

Los polímeros producidos por microorganismos y bacterias naturales o modificadas genéticamente, como por ejemplo la celulosa bacteriana (BC), se consideran hoy en día materiales de gran interés.

1.1. Caracterización microbiológica. Estudio de la identificación de genes responsables de la síntesis de la celulosa en la cepa ID 13488.

La identificación de los genes responsables de la síntesis de celulosa en la cepa ID 13488, se realizó mediante estudios *in silico* de la cepa modelo *G. medellinensis* NBRC 3288, cuyo genoma se encuentra accesible en las bases de datos (Número de acceso: APO12159.1). En el genoma de NBRC 3288, los genes implicados en la biosíntesis de celulosa se localizan entre las coordenadas 2768782 a 2782560. Estos genes incluyen el operón básico *bcsABCD*, así como los genes *bcsZH* y *bcsX*. Basándonos en la secuencia de la cepa modelo (NBR 3288), se diseñaron oligonucleótidos que hibridaban en cada uno de los genes descritos (*bcsABCD*, *bcsZH* y *bcsX*), y se procedió a la amplificación de cada uno ellos mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Para la utilización de ésta técnica, previamente se optimizó la obtención de DNA genómico procedente de la cepa ID 13488 que, posteriormente, se utilizó como DNA molde. Para ello, se utilizaron cultivos de *G. medellinensis* ID 13488 crecidos en medio H-S a pH ácido, en condiciones estáticas, a 28°C, durante 7 días. Una vez analizada la pureza y la integridad del DNA genómico se realizaron ensayos de amplificación (PCR) de los fragmentos de DNA que contendrían los genes *bcs*. Seguidamente, las muestras se analizaron mediante secuenciación, en el Servicio de Secuenciación del CIB (Secugen). Los resultados indicaron que la cepa ID 13488 contiene los genes que codifican la maquinaria implicada en la biosíntesis de celulosa (*bcsABCD*, *bcsHZ* y un homólogo del gen *bcsX*). Estos genes son similares en un 90-95% a los genes de la cepa *G. medellinensis* NBRC 3288.

Dado que los resultados habían indicado que la cepa ID 13488 producía mayor cantidad de celulosa cuando es crecida en el medio AR que cuando se utilizó el medio comercial H-S, se analizaron, mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR), los niveles de expresión del operon *bcs* en cultivos crecidos en los medios AR o H-S, en las condiciones descritas anteriormente (28 °C, pH 4, incubación durante 7 días, en estático). Para ello, se optimizó la extracción y purificación de RNA total procedente de la cepa ID 13488. La pureza y cantidad de este RNA se analizó mediante espectrofotometría, y su integridad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa. Seguidamente, el RNA obtenido se usó como molde para la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa (RT). El cDNA se usó como molde para realizar la PCR en tiempo real, utilizando los oligonucleótidos que previamente habían sido usados para determinar si la cepa ID 13488 codificaba las proteínas BcsA, BcsB, BcsC, BcsD, Bcs H y BcsZ implicadas en la biosíntesis de celulosa. El análisis de expresión génica se está analizando actualmente.

1.2. Biosíntesis y caracterización de la celulosa bacteriana

En este proyecto de investigación, se han empleado dos tipos de medios cultivo: (1) medio de cultivo estándar Hestrin-Schramm (H-S) (2% p/v D-glucosa, 0.5% p/v peptona, 0.5% p/v extracto de levadura, 0.27% p/v di-sodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4) y 0.115% p/v ácido cítrico) y (2) medio de cultivo preparado a partir de residuos de la manzana y azúcar de caña (AR). Para ajustar los nutrientes en el medio AR, se han disuelto en agua diferentes cantidades de azúcar de caña y residuos de manzana triturados y exprimidos. En ambos medios de cultivo se ha utilizado la bacteria *Gluconacetobacter medellinensis*.

El rendimiento de celulosa bacteriana ha sido calculado mediante pesada de las muestras de BC, y los valores obtenidos han sido expresados en g/L respecto al volumen de cada cultivo. La influencia del pH de los medios de cultivo sobre el crecimiento bacteriano ha sido analizada mediante la técnica de recuento en placa. En la Tabla 1 se recogen la composición del medio de cultivo y los rendimientos de la producción de BC de cultivos crecidos a partir de medios en los que se ha variado la relación de residuos de manzana y azúcar de caña (medio AR). Para tener un análisis comparativo, se preparó un medio de cultivo con piel de manzana fresca comercial. El residuo de manzana resultó ser una fuente potencial de nutrientes y carbono para este tipo de bacterias ya que se obtuvieron mayores rendimientos de celulosa en cultivos crecidos a partir de este residuo que los obtenidos a partir de cultivos crecidos en medios comerciales H-S. No se han observado grandes diferencias en la obtención de BC, entre la utilización de la piel de manzana fresca y el residuo de manzana. Como se puede observar, el cultivo crecido en AR (4) presenta el mayor rendimiento, siendo elegido como el medio óptimo, y es el que se ha utilizado para la obtención y caracterización de las membranas de celulosa.

Medio de Cultivo	Relación		Rendimiento (g/L)
	Residuo manzana(g)/caña de azúcar(g)		
Piel de manzana fresca	1/2.3		14.9 ± 4.8
AR (1)	1/2.3		14.4 ± 1.6
AR (2)	0.5/2.8		21.3 ± 8.7
AR (3)	2/1.3		12.5 ± 2.4
AR (4)	1.5/2.3		24.9 ± 3.3
H-S	-		18.4 ± 7.8

Tabla 1. Rendimiento de BC obtenida a partir de medios de cultivo que contienen diferente proporción de residuo de manzana respecto a caña de azúcar.

El rendimiento de producción de celulosa bacteriana depende de muchos factores como el pH, la temperatura, la fuente de carbono y la relación entre el área de la superficie y el volumen de sustrato. Todo microorganismo tiene un pH mínimo, óptimo y máximo para su crecimiento. Para elegir el pH óptimo de crecimiento y de producción de celulosa, en la cepa ID 13488 se han preparado medios de cultivo H-S ajustados a valores de pH 6 y 3.6 (utilizados buffers de fosfato citrato) y medio de cultivo AR(4) ajustados a valores de pH 5.6 y 3.6 (utilizando buffers de acetato de sodio). Además de los cultivos líquidos, se han preparado placas de agar con los mismos medios y los mismos pH-s. El pH de los cultivos líquidos ha sido medido después de 7 días de incubación, a 28 °C en condiciones estáticas, y se ha observado que en todos los cultivos se había producido un descenso del pH del medio hacia valores ácidos. Estos resultados, aunque preliminares, podrían indicar que los medios de cultivo a pH-s ácidos favorecen el crecimiento de este microorganismo. Para comprobarlo, se ha realizado una estimación de la cantidad de microorganismos existente en cada uno de los medios de cultivo mediante recuento en placa de unidades formadoras de colonia (UFC). Además, cuando se ha utilizado el medio AR se han obtenido más UFC/mL que cuando se ha usado el medio H-S, para los mismos valores de pH (Tabla 2). Por otra parte, la utilización de medios con pH ácido evita el crecimiento de otros microorganismos, por lo que se ha elegido el medio AR con pH ácido como el mejor medio de cultivo para el crecimiento y producción de celulosa, a partir de la cepa ID 13488.

Medio de cultivo	pH (t = 0 días)	pH (t = 7 días)	UFC/mL (t = 7 días)
H-S	6	~4	20
H-S	3.6	3-4	28
AR(4)	5.6	~4	14
AR(4)	3.6	3-4	44

Tabla 2. Medidas de pH y número de unidades formadoras de colonias.

Por otra parte, se ha procedido a la caracterización y determinación de oxígeno disuelto de los medios de cultivo. El método Winkler se emplea para determinar la concentración de oxígeno disuelto en muestras de agua, en este caso en los medios de cultivo panela-residuo de manzana y H-S. Los resultados obtenidos de concentración de oxígeno (mg O₂/L) con respecto al tiempo de incubación se muestran en la Figura 1. Se han realizado extracciones de las muestras de los cultivos

de H-S y de residuo de manzana-panela en los días 1, 2, 6, 8, 10 y 13 de incubación. Como se puede observar en la Figura 1 desde el cuarto día hasta el décimo, el descenso de la cantidad de oxígeno disuelto en los cultivos es más pronunciado, lo que puede estar relacionado con la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Esto parece correlacionarse con la producción de celulosa bacteriana, ya que la primera película de BC normalmente comienza a aparecer el cuarto día de incubación. En el medio de residuos de manzana/caña de azúcar el consumo de oxígeno es gradual mientras que en el medio H-S desde el sexto día el consumo experimenta una caída mucho más pronunciada. El porcentaje de decrecimiento es de $65\% \pm 2$ en el medio H-S y de $80\% \pm 2$ en el medio de residuos de manzana/caña de azúcar.

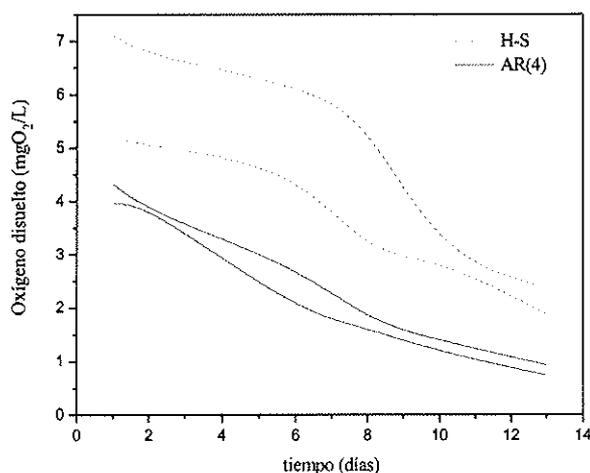


Figura 1. Concentración de oxígeno disuelto (mg O₂/L) a diferentes tiempos de incubación determinados mediante el método Winkler en los cultivos de H-S y de residuo de manzana/caña de azúcar.

Mediante Cromatografía Iónica se ha determinado cuantitativamente el contenido de diversos carbohidratos presentes en los medios de cultivo utilizando la técnica de medida HPAE-PAD (High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection). Los carbohidratos analizados, a partir de estándares de los mismos, en el medio de cultivo han sido glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. Los resultados obtenidos para el cultivo AR(4) a tiempos 0, 7 y 13 días aparecen reflejados en la Tabla 3.

Medio de Cultivo	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Maltosa (g/L)
AR(4)-0	5.2	5.4	87.1	-
AR(4)-7	4.7	4.7	81.1	-
AR(4)-13	4.0	4.6	80.1	-

Tabla 3. Contenido de carbohidratos del medio de cultivo AR(4) a tiempo 0, 7 y 13 días.

Como se puede observar, la mayor disminución es de la glucosa, seguido de la fructosa y en menor medida la sacarosa, siendo insignificante la cantidad de maltosa.

En la Figura 2 se muestra una membrana de celulosa bacteriana obtenida a partir de las condiciones mencionadas anteriormente. En la imagen se puede observar, a los 13 días de biosíntesis se obtiene un hidrogel de 0.7-1 cm de espesor que contiene alrededor del 99 % de agua. A continuación se detalla la caracterización realizada de acuerdo a su grado de polimerización (PD), cristalinidad (CI) y capacidad de retención de agua (WHC). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

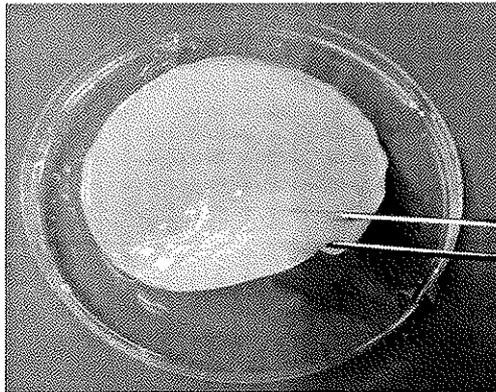


Figura 2. Membrana de celulosa bacteriana obtenida en las condiciones AR(4)

Muestra	CI	PD	WHC (%)
BC de H-S	0.68	3304 ± 297	229 ± 18
BC de AR(4)	0.80	3800 ± 374	3521 ± 666

Tabla 4. Grado de polimerización (PD), cristalinidad (CI) y capacidad de retención de agua (WHC) de las membranas de celulosa bacteriana.

El grado de polimerización de las celulosas ha sido obtenido a partir de medidas de viscosidad, según el procedimiento descrito en la norma estándar ASTM D1795. Los valores de viscosidad han sido expresados como grado de polimerización empleando la ecuación de Marx-Figini. Generalmente, el grado de polimerización depende de las condiciones de cultivo del microorganismo (tiempo de fermentación, fuente de carbono y pH) pero en este caso se han obtenido valores similares, siendo el grado de polimerización de la celulosa obtenida a partir de los cultivos crecidos con los residuos de manzana ligeramente superior. El grado de polimerización de la celulosa bacteriana suele estar generalmente comprendido entre 2000 y 6000, pero en algunos casos puede alcanzar valores mayores. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites encontrados en la bibliografía.

La cristalinidad de la celulosa se ha obtenido mediante ensayos de difracción de rayos X (Figura 3). La ecuación de Segel permite obtener el índice de cristalinidad de la celulosa a partir de la altura de los picos a 2 θ , 22 y 18 °. De los valores mostrados en la Tabla 4, se observa que la BC obtenida de residuo de manzana tiene un índice de cristalinidad mayor (0.8) en comparación al obtenido en la

BC del medio H-S (0.68). Esta diferencia puede atribuirse a que durante la biosíntesis de la celulosa el proceso de empaquetamiento se ha visto favorecido en el medio AR(4), resultando una celulosa con un índice de cristalinidad mayor.

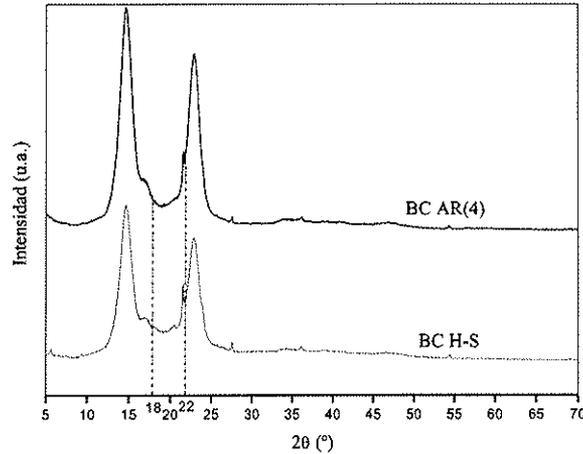


Figura 3. Patrones de difracción de rayos X de las muestras de celulosa bacteriana obtenidas en los dos medio de cultivo.

Otro factor importante analizado es la capacidad de retención de agua (WHC) de las membranas de celulosa bacteriana. Este parámetro ha sido calculado secando las membranas durante 3 días a 50 °C en un horno (W_{seco}), e introduciendo después las membranas en agua desionizada hasta peso constante ($W_{húmedo}$) y aplicando la siguiente ecuación:

$$WHC(\%) = \left(\frac{W_{húmedo} - W_{seco}}{W_{seco}} \right) \cdot 100$$

La capacidad de retención de agua de los materiales celulósicos está relacionada con la porosidad y el área superficial. En el caso de la BC, la matriz consiste en fibras reticuladas formando una estructura 3D tipo red, con huecos entre ellas, y con una capacidad de retención de agua alta. En este caso, el valor de retención de agua ha sido notablemente mayor para la celulosa obtenida a partir del residuo de manzana. Esto puede estar relacionado con el tamaño de las fibras. La estructura de las fibras ha sido analizada mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) (Figura 4). Se ha visto que las fibras de la BC obtenida del residuo de manzana han resultado ser más finas y largas, creando una estructura muy reticulada con muchos huecos entre ellas. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía, donde se reporta que las muestras de celulosa bacteriana con fibras más delgadas y largas tienen alta capacidad de retención de agua. Por otra parte, las celulosas tienden a agregarse mediante fuertes enlaces por puente de hidrógeno, dando lugar a una menor tendencia a retener agua. La espectroscopia infrarroja (FTIR) es una técnica muy valiosa para el estudio de las interacciones por puente de hidrógeno. Las celulosas obtenidas se han caracterizado mediante FTIR (Figura 5), pudiéndose observar una mayor cantidad

de enlaces por puente de hidrógeno (OH-s asociados alrededor de 3335 cm^{-1}) en la celulosa obtenida del cultivo comercial H-S, lo que podría justificar su baja capacidad de retención de agua.

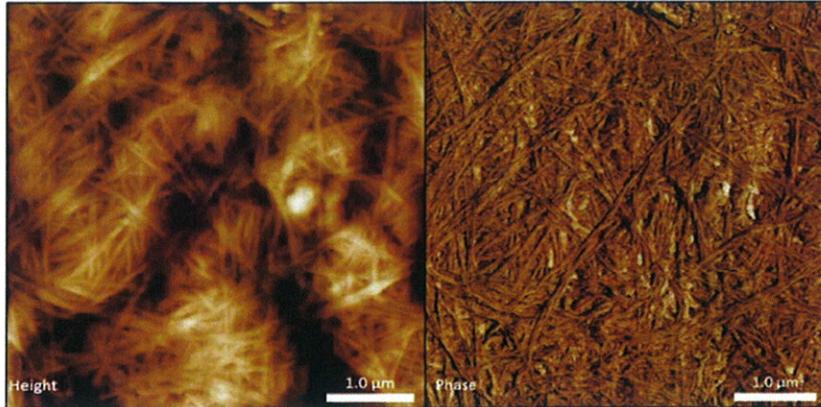


Figura 4. Imagen AFM de la superficie de la membrana de celulosa bacteriana obtenida en las condiciones AR(4).

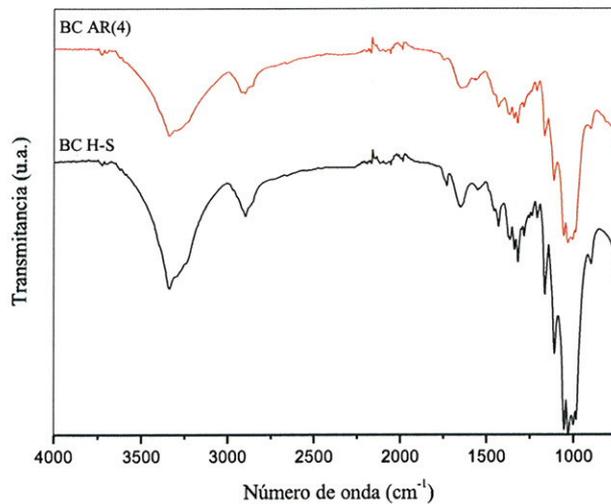


Figura 5. Curvas de espectroscopía infrarroja obtenidas para las celulosas bacterianas obtenidas en los dos medio de cultivo.

El comportamiento térmico de la BC fue analizado mediante análisis termogravimétrico en atmósfera de nitrógeno (Figura 6). Para ambas celulosas se obtuvieron resultados similares, mostrando una primera pérdida de masa a unos 100 °C asociada a la liberación de agua y otros volátiles de la celulosa y una segunda pérdida muy pronunciada entre 300 y 400 °C asociada a la degradada térmica de la celulosa hasta una ligera degradación hasta alcanzar los 800 °C .

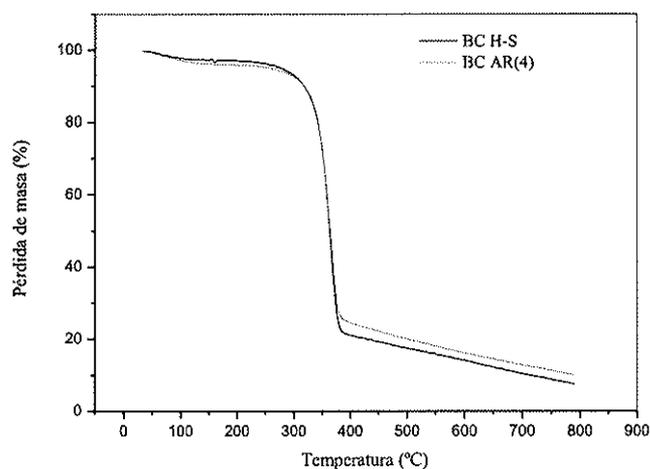


Figura 6. Análisis termogravimétrico de la membrana de celulosa bacteriana obtenida en las condiciones AR(4) y la membrana H-S.

Las propiedades mecánicas de las celulosas se analizaron mediante ensayos de tracción. La Tabla 5 recoge los valores de módulo de Young (E), resistencia (σ_b) y elongación a rotura (ϵ_{max}) obtenidos en el ensayo. La celulosa bacteriana obtenida a partir de residuo de manzana resultó tener propiedades mecánicas superiores a la obtenida a partir del H-S, presentando mayor módulo y resistencia. Es conocido que el grado de cristalinidad tiene una gran influencia en la resistencia mecánica, de ahí que el valor más elevado del módulo de Young de la celulosa bacteriana obtenida a partir del residuo de manzana puede atribuirse a su alta cristalinidad, tal y como se ha especificado en la Tabla 4. Además, el grado de polimerización también tiene relación con las propiedades mecánicas, ya que cuanto mayor es, mayor es su efecto en la resistencia mecánica.

Muestra	E (MPa)	ϵ_{max} (%)	σ_b (MPa)
BC de H-S	6749 ± 2157	1 ± 0.6	50 ± 34
BC de AR(4)	10413 ± 1191	2 ± 0.6	89 ± 30

Tabla 5. Propiedades mecánicas de las membranas de celulosa bacteriana

TAREA 2. Obtención de nanocelulosas cristalinas utilizando métodos de extracción químicos (meses 4-10)

A partir de la membrana de celulosa bacteriana obtenida en la tarea 2, se procedió a la extracción de nanocelulosas cristalinas mediante procesos de extracción químicos. Estudios previos de bibliografía demostraron que el ácido sulfúrico es un ácido adecuado para la degradación y eliminación de la parte amorfa de la celulosa y posterior recuperación o extracción de nanocelulosas cristalinas. Aunque en un primer momento se planteó la posibilidad de utilizar ácido clorhídrico, las referencias bibliográficas demostraron la mayor efectividad del ácido sulfúrico para este tipo de procesos por lo que se realizó la optimización de los parámetros del tratamiento de hidrólisis ácida variando el estado inicial de la celulosa (membrana húmeda o seca) como las condiciones del proceso (concentración de ácido, temperatura y tiempo). La optimización para la obtención de las nanocelulosas cristalinas se ha realizado según los procedimientos:

Procedimiento 1. A partir de membrana en estado seco

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo con H_2SO_4 al 64 % a 45 °C durante 30 min. La suspensión fue centrifugada y lavada hasta una completa neutralización. El análisis de las muestras obtenidas mediante AFM (Figura 7) permitió observar que el proceso de hidrólisis no había sido suficientemente efectivo debido a que se observó una morfología heterogénea con numerosos agregados de gran tamaño ($> 10 \mu\text{m}$). A partir de los resultados obtenidos, se decidió prolongar el tiempo de hidrólisis y cambiar el estado inicial de la membrana a membrana húmeda.

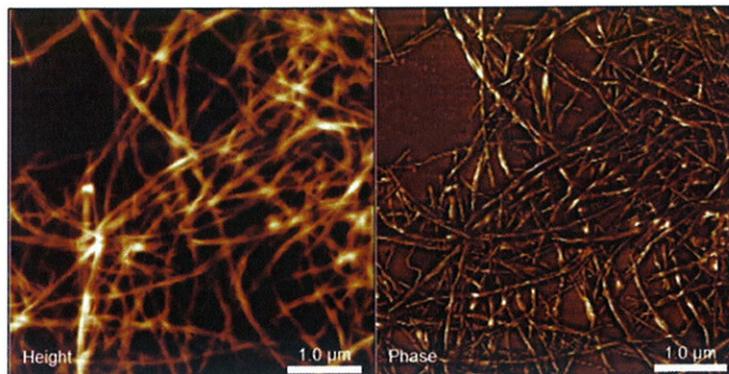


Figura 7. Imagen de AFM obtenida después de la hidrólisis ácida a partir de la membrana en estado seco.

Procedimiento 2. A partir de membrana en estado húmedo

- A) Se hidrolizó la membrana húmeda en las mismas condiciones que en procedimiento 1 pero variando el tiempo a 1 h. El análisis de las muestras mediante AFM (Figura 8) mostró una morfología más homogénea aunque el tamaño de las nanocelulosas era superior a $1 \mu\text{m}$ por lo que se decidió aumentar el tiempo de hidrólisis.

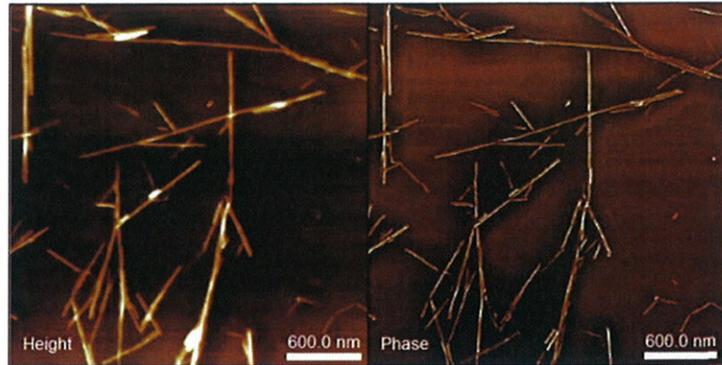


Figura 8. Imagen de AFM obtenida después de 1h de hidrólisis ácida a partir de la membrana en estado húmedo.

- B) Finalmente se realizó la hidrólisis ácida siguiendo el procedimiento del apartado 2A, pero aumentando el tiempo de hidrólisis a 1h 30min. El análisis realizado mediante AFM (Figura 9) permitió observar una distribución más homogénea en cuanto a diámetros y longitudes de nanocelulosas cristalinas por lo que se concluyó que el proceso de hidrólisis óptimo para la extracción de nanocelulosas cristalinas a partir de celulosa bacteriana era el siguiente: H_2SO_4 al 64% a 45°C durante 1h 30min con membrana en estado húmedo.

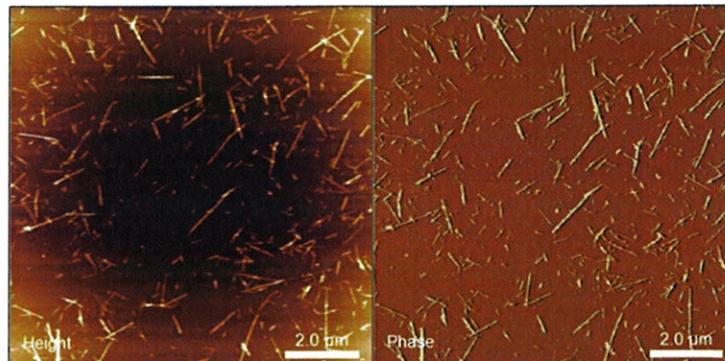


Figura 9. Imagen de AFM obtenida después de 1h 30min de hidrólisis ácida a partir de la membrana en estado húmedo.

TAREA 3. Determinación de las propiedades finales de las nanocelulosas cristalinas (meses 6-11)

Una vez obtenidas las nanocelulosas cristalinas se procedió a su caracterización. Tal y como se ha comentado en el Tarea 2, el criterio utilizado para la elección de las propiedades óptimas de tratamiento se realizó mediante el análisis de la morfología utilizando la técnica de AFM, donde se realizaron diversas pruebas hasta llegar a la extracción nanocelulosas cristalinas con un elevado rendimiento (no agregados) y con una relación de aspecto (L/D) aceptable. La relación de aspecto de las nanoentidades es un parámetro muy importante para la preparación de nanocomposites. Tal y como se puede observar en las Figuras 8 y 9 las nanocelulosas cristalinas obtenidas tienen una distribución de tamaños aceptables por lo que se consideran nanorefuerzos de origen renovable con un alto valor añadido. En la Tabla 6 se recogen las dimensiones y la relación de aspecto de las nanocelulosas obtenidas en los procedimientos 2A y 2B.

	L (nm)	D (nm)	Relación de aspecto
Procedimiento 2A	652±422	46±0.0188	14
Procedimiento 2B	558±200	35±0.0151	16

Tabla 6. Parámetros importantes de tamaño de las nanocelulosas obtenidas en las etapas 2 y 3.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la caracterización físico-química realizada a los nanorefuerzos de celulosa bacteriana. En la Figura 10 se muestra el espectro correspondiente a las nanocelulosas cristalinas obtenidas en la hidrólisis ácida donde se puede apreciar un pico más pronunciado correspondiente a los OH asociados por puentes de hidrógeno.

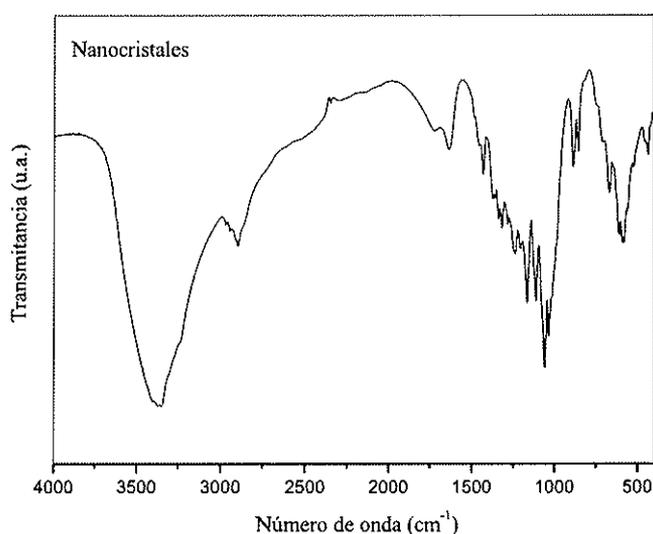


Figura 10. Espectro infrarrojo de las nanocelulosas cristalinas.

Otro aspecto importante, es la estabilidad térmica de estas nanocelulosas para conocer su temperatura en servicio en combinación con otros polímeros en procesos de extrusión, inyección... Los nanocristales presentan buena estabilidad térmica, prácticamente igual a la membrana de celulosa bacteriana lo que le permitirá incorporarse a la mayoría de los polímeros convencionales.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto han dado lugar a nuevas vías de trabajo en ambos grupos de investigación. En la primera parte de este proyecto se ha estudiado en profundidad el proceso de biosíntesis de la celulosa bacteriana a partir del residuo de la manzana. El trabajo ha sido o será presentado en las siguientes conferencias científicas regionales, nacionales e internacionales:

- *Hybrid bionanocomposites by in-situ assembling of bacterial cellulose/montmorillonite clay* (6th Workshop on Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymer Chemistry, Braganza, Portugal, Julio 2015)

- *Balio erantsidun nanoerrefortzuak: sagardogintza hondakinen ustiapenetik lortutako zelulosa nanokristalak* (II. Materialen Zientzia eta Teknologia III. Kongresua, Markina, España, Julio 2016)

- *Bacterial cellulose nanocrystals from cider by-products: high value nanoreinforcements* (ISPB2016 Madrid, España, Septiembre 2016)

- *Use of cider by-products for the production of functional materials: bioactive bacterial cellulose membranes* (N.I.CE, Niza, Francia, October 2016)

Además el trabajo realizado ha dado lugar a varias publicaciones en revistas científicas internacionales indexadas:

- *By products of the cider production: alternative source of nutrients to produce bacterial cellulose*. Enviado a Bioresource Technology

- *High value nanoreinforcements from cider waste: Bacterial cellulose nanocrystals*. En preparación

Esta investigación ha permitido paralelamente la posibilidad de trabajar con otras fuentes de carbono no convencionales en la biosíntesis de celulosa bacteriana (residuos de otras industrias agrícolas) e incluso en la utilización de membranas de celulosa bacteriana para la preparación de bionanocomposites. Esta investigación ha dado lugar a los siguientes artículos, uno publicado, otro ya aceptado, otro enviado y 2 en preparación:

- *Improved Permeability Properties for Bacterial Cellulose/Montmorillonite Hybrid Bionanocomposite Membranes by In-Situ Assembling*, en Journal Renewable Materials 4, 57-65 (2016)
- *Biodegradable composites with improved barrier properties and transparency from the impregnation of PLA to bacterial cellulose membranes*, en el Journal of Applied Polymer Science. Aceptado

- *Maleimide-grafted cellulose nanocrystals as cross-linkers for bionanocomposite hydrogels.*
Enviado a Carbohydrate Polymers
- *New materials based on renewable resources: Preparation and characterization of Polyurethane/bacterial cellulose bionanocomposites.* En preparación
- *Enhanced mechanical and barrier properties of starch-bacterial cellulose bionanocomposites.*
En preparación

Tal y como se plasmó en la memoria del proyecto, los integrantes del grupo GMT son profesores del Máster de Investigación en Ingeniería de Materiales Renovables del Programa de Doctorado en Ingeniería de Materiales Renovables, reconocido con la Mención de Excelencia (MEE2011-0372), por lo que los avances originados en el desarrollo del proyecto han sido y podrán ser transmitidos para a los estudiantes de dicho Máster.

COLABORACIONES

Este trabajo ha permitido la colaboración de dos grupos de investigación como son el Grupo GMT de la UPV/EHU y el Grupo POLYBIO del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Además en el transcurso de este proyecto, una investigadora del grupo GMT ha realizado una estancia de investigación de 15 días en el centro POLYBIO para estudiar las características microbiológicas de la bacteria generadora de celulosa y del proceso de biosíntesis y se espera que pueda seguir habiendo más colaboraciones en un futuro. Además a lo largo del desarrollo del proyecto se han realizado diversas reuniones tanto a través de videoconferencias como presenciales, lo que ha permitido a ambos grupos compartir e intercambiar experiencias y transferencia de conocimiento en ambos sentidos. Este trabajo ha sido el principio de la base para desarrollar conjuntamente (GMT y POLYBIO) nuevas ideas e iniciativas permitiendo la evolución científica de ambos grupos que contribuyen a la investigación e innovación.