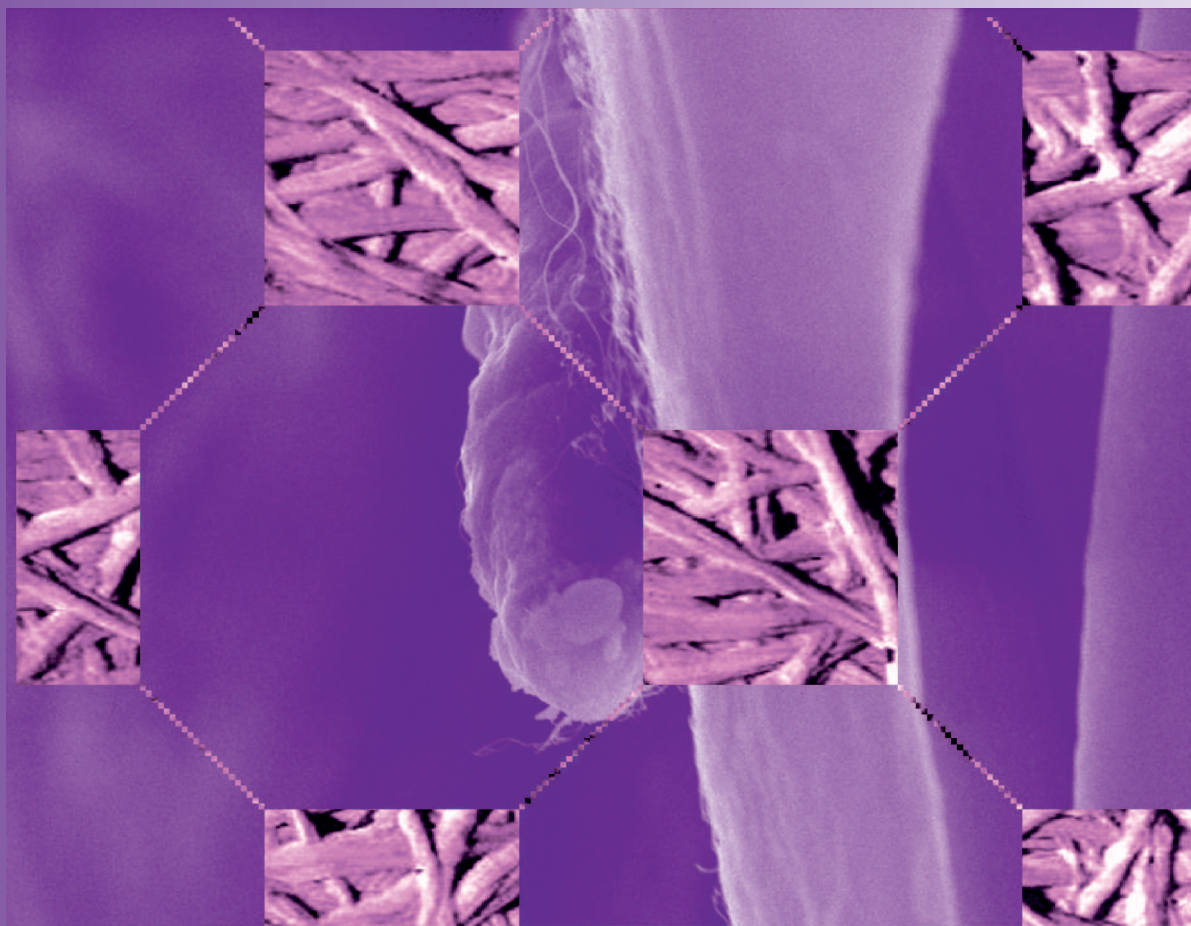


BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA ETA BIONANOKONPOSITEEN PRESTAKUNTZA ETA KARAKTERIZAZIOA

ITXASO ALGAR PETRALANDA



BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA ETA BIONANOKONPOSITEEN PRESTAKUNTZA ETA KARAKTERIZAZIOA

ITXASO ALGAR PETRALANDA-k

Doktore Maila lortzeko aurkezturiko Txostena

Donostia, 2017ko Ekaina

ESKERRAK

Azken urteetan nire tesi zuzendari izan diren Aloña Retegí eta Arantxa Eceiza doktoreak eskertu nahiko nituzke, bakterio-zelulosaren inguruko ikerketa hau burutzeko aukera emateagatik. Bien artean, tandem ona osatu dutelako eta euren ezagutza eta lana ezinbestekoak izan dira lan hau bukatzeko garaian. Aipamen berezi bat egin nahiko nioke, eta nire eskerrik beroenak adierazi năaki Bixintxo Mondragon Egaña doktoreari, lan honen bultzatzaile nagusiari, nahiz urte batzuk gure bizitzatik kanpo egon beti izan eta izango baita presente.

Euskal Herriko unibertsitatea (UPV/EHU) doktoretza burutu ahal izateko emandako diru-laguntzagatik eskertu nahiko nuke (doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntza (IPF10/2010/IPF10053). Bestalde, Euskal Herriko unibertsitateko SGIker zerbitzua ere eskertu nahiko nuke.

Gipuzkoako Ingeniaritza Eskolako irakasle eta ikaskideak ere eskertu nahiko nituzke, karrerako urteetan laguntzeaz gain doktoretzako urte hauetan ere laguntza eskaini didatenak.

Nire eskerrak 'Materialak + Teknologia' Taldeko kideei helarazi nahi dizkiet, elkarrekin pasa ditugun momentu on guztiengatik. Nire ikerketa ezinezkoa litzateke beraien laguntzarik gabe eta bereziki azken hilabete gogor hauetan nire ondoan egon direnak eskertu nahiko nituzke, eman didaten laguntza eta animo guztiengatik.

Nire eskerrik beroenak etxekoéi eskaini nahi dizkiet jasotako erabateko babes, maitasuna eta laguntzarengatik. Azken finean, tesi hau guztiena da, aita-ama eta neba, eskerrik asko bihotzez nigan sinesteagatik eta momentu guztietan hor izateagatik. Bukatzeko, Aitorri eskertu nahiko nioke, urte guzti hauetan, momentu txar zein onenetan nire ondoan izan zarelako. Behar izan dudan guztia emateagatik, animatzeagatik eta laguntzeagatik. Bihotzez eskerrik asko guztiagatik.

Besterik gabe, eskerrik asko Tesi hau aurrera ateratzeko parte hartu duzuen guztioi, zuen laguntzarik gabe hau ez baitzen posible izango.

“Life is not easy for any of us. But what of that?”

*We must have perseverance and above all confidence in ourselves.
We must believe that we are gifted for something and that this thing
must be attained.”*

- Marie Skłodowska-Curie

“You must never be fearful of what you are doing when it is right.”

- Rosa Parks

Jada ez daudenen oroimenez...

AURKIBIDEA

I. SARRERA	3
I.1. MOTIBAZIOA	3
I.2. HELBURUA	4
I.3. ZELULOSA	5
I.3.1. Zelulosaren egitura kimikoa	6
I.3.2. Zelulosaren iturriak	8
I.3.3. Bakterio-zelulosa	8
I.3.4. Ingurune konposizioaren eragina	11
I.3.5. Hartzidura-baldintza ezberdinak	13
I.3.6. Gehigarrien eragina	14
I.3.7. Beste faktore batzuk	15
I.4. BAKTERIO-ZELULOSAN OINARRITUTAKO BIONANOKONPOSITEAK	16
I.4.1. <i>In-situ</i> BZ bionanokonpositeen prestakuntza	16
I.4.2. <i>Ex-situ</i> BZ bionanokonpositeen prestakuntza	18
I.5. BAKTERIO-ZELULOSAREN APLIKAZIOAK	21
I.6. BIBLIOGRAFIA	23
II. MATERIALAK ETA TEKNIKA ESPERIMENTALAK	35
II.1. MATERIALAK	35
II.2. KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA	36
II.2.1. Inguruneen azukre eta oinarrizko analisia	36
II.2.2. Disolbaturiko oxigeno edukia	36
II.2.3. Etekina	37
II.2.4. Polimerizazio-maila	37
II.2.5. Gel-iragazkorreko kromatografia	38
II.2.6. Indukzio bidez akoplatutako plasma iturridun masa-espektrometroa	38
II.2.7. Porotasuna	39
II.2.8. Fourier-en transformatuaren espektroskopia infragorria	39
II.2.9. Erresonantzia magnetiko nuklearra	40
II.2.10. X-lzpien difrakzioa	40
II.2.11. Izpi ultramore-ikuskorreko espektrofotometroa	40
II.2.12. Ur-xurgapena	41
II.2.13. Ur-atxikipen gaitasuna	41
II.2.14. Kontaktu-angelua	42
II.3. KARAKTERIZAZIO TERMIKOA	42
II.3.1. Analisi termograbitmetrikoa	42
II.3.2. Ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala	42
II.4. KARAKTERIZAZIO MEKANIKOA ETA MEKANIKO-DINAMIKOA	42

AURKIBIDEA

II.4.1. Trakzio saiakuntza	42
II.4.2. Analisi mekaniko-dinamikoa	43
II.5. KARAKTERIZAZIO MORFOLOGIKOA	43
II.5.1. Mikroskopia optikoa	43
II.5.2. Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa	43
II.6. IRAGAZKORTASUNA	43
II.6.1. Ur-lurrunarekiko iragazkortasuna	44
II.6.2. Oxigenoarekiko iragazkortasuna	44
II.7. <i>IN VITRO</i> ERANTZUN ZELULARRA	44
II.7.1. Zitotoxikotasuna	44
II.7.2. Zelulen itsaspena	45
II.8. BIODEGRADAGARRITASUNA	46
II.9. BIBLIOGRAFIA	46
III. BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA	51
III.1. HELBURUA	51
III.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA	51
III.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	53
III.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa	53
III.3.2. Morfologia azterketa	61
III.3.3. <i>In vitro</i> erantzun zelularraren azterketa	66
III.4. ONDORIOAK	68
III.5. BIBLIOGRAFIA	69
IV. BAKTERIO-ZELULOSA ETA MONTMORILLONITA BIONANOKONPOSITEAK	73
IV.1. HELBURUA	73
IV.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA	73
IV.2.1. MMT dispertsioen prestakuntza	73
IV.2.2. BZMMT bionanokonpositeen prestakuntza	74
IV.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	75
IV.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa	75
IV.3.2. Morfologia azterketa	82
IV.3.3. Azterketa termikoa	83

AURKIBIDEA

IV.3.4. Portaera mekanikoa	86
IV.3.5. Iragazkortasun azterketa	89
IV.3.6. Biodegradagarritasun azterketa	91
IV.4. ONDORIOAK	93
IV.5. BIBLIOGRAFIA	93
V. BAKTERIO-ZELULOSA, MONTMORILLONITA ETA ALMIDOI TERMOPLASTIKOZKO BIONANOKONPOSITEAK	99
V.1. HELBURUA	99
V.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA	99
V.2.1. Almidoi termoplastikozko matrizearen prestakuntza	99
V.2.2. ATPBZ eta ATPMMTBZ bionanokonposite filmen prestakuntza	100
V.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	102
V.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa	102
V.3.2. Azterketa termikoa	106
V.3.3. Portaera mekanikoa	112
V.3.4. Iragazkortasun azterketa	115
V.3.5. Morfologia azterketa	117
V.3.6. Biodegradagarritasun azterketa	117
V.4. ONDORIOAK	119
V.5. BIBLIOGRAFIA	119
VI. BAKTERIO-ZELULOSA ETA URETAN OINARRITUTAKO POLIURETANO NANOKONPOSITEAK	125
VI.1. HELBURUA	125
VI.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA	125
VI.2.1. Uretan oinarritutako poliuretanoaren sintesia	125
VI.2.2. Bakterio-zelulosa eta uretan oinarritutako poliuretano nanokonpositeen prestakuntza	127
VI.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	129
VI.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa	129
VI.3.2. Morfologia azterketa	133
VI.3.3. Azterketa termikoa	134
VI.3.4. Portaera mekanikoa	139
VI.3.5. Iragazkortasun azterketa	144
VI.4. ONDORIOAK	145
VI.5. BIBLIOGRAFIA	144

AURKIBIDEA

VII. ONDORIO OROKORRAK, ETORKIZUNERAKO LAN-ILDOAK ETA ARGITALPENAK	151
VII.1. ONDORIO OROKORRAK	151
VII.2. ETORKIZUNENERAKO LAN-ILDOAK	154
VII.3. ARGITALPENAK	155
VII.3.1. Argitalpen zerrenda	155
VII.3.2. Kongresuen zerrenda	156
ERANSKINAK	161
IRUDIEN ZERRENDA	161
TAULEN ZERRENDA	166
LABURDUREN ZERRENDA	168
IKURREN ZERRENDA	170

I. Atala

SARRERA

I. SARRERA

I.1. MOTIBAZIOA

Azken urteetan, petroleoa baliabide geroz eta mugatuagoa izatearekin batera, ingurumenarekiko sentikortasuna eta ardura nagusitu izanagatik, hainbat biopolimero garatzen ari dira iturri fosiletatik eratorritakoak ordezkatzeko (Rudin eta Choi, 2013). Biopolimeroen artean, polisakaridoak daude eta hauen artean, besteak beste zelulosa aurkitu daiteke.

Orokorrean, gehien erabili izan den landare jatorrizko zelulosaz gain, bakterio edo mikroorganismo genero batzuek era naturalean zelulosa sintetizatzen dute, mikrobio zelulosa edo bakterio-zelulosa (BZ) bezala ezaguna dena (Brown, 1886). Zelulosa mota hau lortzeko, gehien erabilia izan den bakterio-anduia *Acetobacter xylinum* izan da (*Gluconacetobacter* generoan birsailkatu dena *G.xilynus* izenarekin) (Yamada et al., 1997). Bakterio honek, substratu gisa karbono iturri ezberdinak erabiliz, hartxidura prozesu baten bitartez zelulosa biosintetizatzen du. Beraz, BZ-ren desabantail nagusien artean, bere biosintesisirako karbono iturrien kostua izan daiteke, produkzio kostua handitzen baitute. Horretarako, azken urteetan kostu baxuko ez-ohiko karbono iturri ezberdinak ikertzen dituzten hainbat lan argitaratu dira, zelulosaren produkzio kostua murrizteko asmoarekin (Keshk eta Sameshima, 2006a). Produkzio eraginkorra lortzeko, beharrezkoa da hartxidura-baldintzak optimizatzea: hala nola, substratua (karbono iturriak), ingurunearen tenperatura, pH-a eta agitazioa, besteak beste (Chawla et al., 2009; Cheng et al., 2009; Castro et al., 2012). Beraz, ozpin saldatik erauzitako bakterio-andui berri batekin eta hondakin solidoetatik eratorritako ez-ohiko ingurunea substratu gisa erabiliz, hartxidura-baldintza ezberdinetan (estatikoa eta dinamikoa), zelulosaren biosintesi prozesuan ikerketa sakona burutzea interesgarria litzateke, lehengai merke batzuetatik abiatuz, balio erantsidun material bat lor daitekeelako (Vandamme et al., 1998).

Bestalde, BZ-ren propietate paregabeak direla eta, bionanokonpositeetan matrize zein indargarri bezala erabiltzeko hautagai egokia bilakatzen da. Zelulosa mintzaren ezaugarriak aprobeztatuz, bere horretan erabiltzea aukera paregabea izan daiteke hainbat aplikazioetarako. Hortaz, tesi honetan bakterio-zelulosaren sintesian eragiten duten hainbat aldagai aztertu dira. Ezaugarri eta propietate balantze interesgarrienak dituzten zelulosa produkzio baldintzak, mintz hibridoaren *in-situ* biosintesisirako ere erabili dira. Ondoren bai bakterio zelulosa mintza eta bakterio-zelulosan oinarritutako mintz hibridoa, almidoi termoplastikoarekin bionanokonpositeak *ex-situ* prestatzeko erabili

dira. Azkenik, iturri berriztagarrietatik eratorritako poliola erabiliaz laborategian sintetizaturiko uretan oinarritutako poliuretano batekin, bionanokonpositeak *ex-situ* ere prestatu dira. Lorturiko bakterio-zelulosa eta bakterio-zelulosan oinarritutako mintz hibridoak eta eratorritako bionanokonpositeen karakterizazio fisiko-kimikoa, termiko-dinamiko-mekanikoa eta morfologikoa burutu da. Horretaz gain, iragazkortasun, biodegradagarritasun eta biokonpatibilitate entseiuak burutu dira zenbait sistematan.

1.2. HELBURUA

Lan honen helburu orokorra bakterioetatik edota mikroorganismoetatik eratorritako zelulosa (bakterio-zelulosa) eta zelulosa honetan oinarrituriko bionanokonpositeak prestatzea eta karakterizatzea izan da, fruitu hondakin solidoetatik eratorritako lehengaietatik abiatuz eta uretan disolbagarriak edo dispertsagarriak diren polimeroetatik (disolbatzaile organikorik gabeko prozesu garbiak erabiliz), propietate leiho zabala aurkezten duten materialak sintetizatu direlarik. Horregatik, berariazko helburuak ondorengoak dira:

1. Bakterio bidezko zelulosaren (BZ) ekoizpenean baldintza eta ingurune ezberdinak duten eragina aztertzea ondoren bionanokonpositeetan propietate konbinaketa egokienak aurkezten dituen erabiltzeko asmoarekin.
2. Bakterio-zelulosaren biosintesiaren zehar, hartidura-ingurunean montmorillonita nanobuztinak (MMT) gehituaz, *in-situ* teknika erabiliz BZMMT mintz hibridoak lortzea.
3. Almidoi termoplastiko (ATP) eta bakterio-zelulosa portzentai ezberdinetako ATPBZ bionanokonposite gardenen garapena *ex-situ* teknikaren bidez, eta zelulosak bukaerako propietateetan duen eragina aztertu.
4. Bakterio-zelulosa/montmorillonita mintz hibridoak almidoi termoplastikoarekin *ex-situ* teknikaren bidez inpregnatu, ATPBZMMT bionanokonpositeak prestatzeko, almidoi filmaren gardentasuna mantenduz eta azken honekin konparatuz, propietate hobetuak lortzea.
5. Arto azukretik eratorritako polioli bat erabiliz uretan oinarritutako poliuretanoa (UPU) sintetizatu eta BZ eduki ezberdineko UPUBZ bionanokonpositeen prestakuntza *ex-situ* teknikaren bidez.

Honela tesi hau zazpi ataletan banatzen da. Lehen atalean (I.atala), sarrera orokor bat egiten da, eta bertan bakterio-zelulosaren biosintesia eta sintesian eragin dezaketen

faktoreak, egitura-propietate erlazioa, aplikazioak eta azkenik, BZ-n oinarritutako bionanokonposite ezberdinen berrikuspen bibliografikoa azaltzen dira. Jarraian nanokonpositeen definizioa, lortze prozesuak eta aplikazioak aurkezten dira eta honela, tesi honetan nanokonpositeak prestatzeko erabili diren bi matrize, almidoia eta uretan oinarritutako poliuretanoa eta nanokarga gisa erabili den montmorillonita nanobuztina aurkezten dira. Bigarren atalean (II.atala), lan esperimentalean erabili diren materialak eta karakterizazio teknikak eta baldintzak azaltzen dira.

Hirugarren eta laugarren atalean, bakterio-zelulosaren sintesia eta karakterizazioan lortutako emaitzak azaltzen dira, baldintza eta hartzidura-ingurune ezberdinetan lorturiko zelulosaren sintesia (III. atala) eta ingurunean bertan nanobuztin naturalak gehituaz, hau da, *in-situ* teknikaren bidez, BZMMT mintz hibridoaren sintesia (IV. atalean) eta karakterizazioa. Bi atal hauetan, baldintza ezberdinek amaierako propietateetan duten eragina aztertu da.

Bostgarren atalean (V. atala), almidoi termoplastikoan oinarritutako bionanokonposite sistema ezberdinen prestakuntza deskribatzen da, BZ-an eta BZMMT-an oinarrituak, *ex-situ* teknika erabiliz, lortutako sistema ezberdinen karakterizazioa burutu delarik. Amaitzeko seigarren atalean (VI. atala), uretan oinarritutako poliuretanoaren sintesia egin da eta berarekin bakterio-zelulosa/poliuretano nanokonpositeak lortu dira *ex-situ* edo inpregnazio teknikarekin eta beraien karakterizazioa burutu da.

Azkenik, zazpigarren atalean (VII. atala), lan honetan lortutako ondorio orokorrak eta argitalpenak laburbiltzen dira, etorkizunerako lan-ildoak proposatzeaz gain.

I.3. ZELULOSA

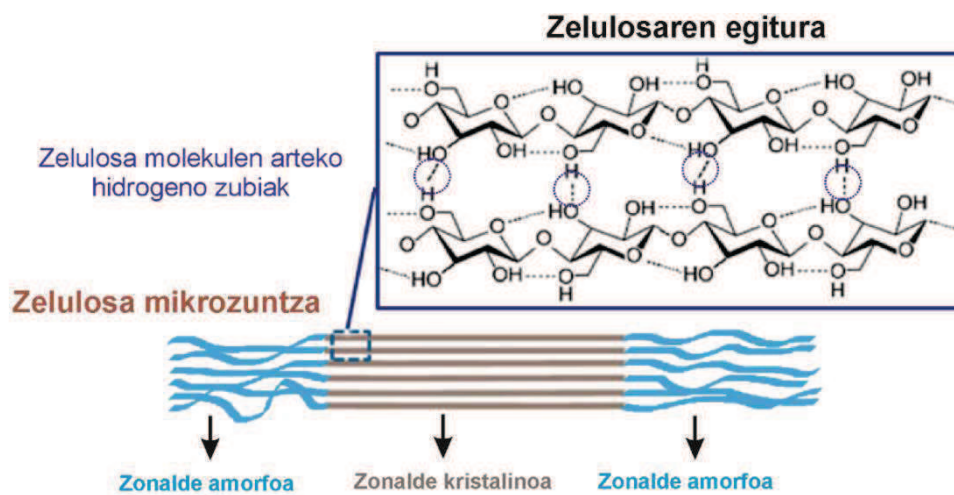
Zelulosaren lehen aztarnak, A. Payen kimikari frantziarrarenak dira 1838an, landare ehunetan burututako tratamendu azidoen ondoren lortutako fibrosolidoa aurkeztu zuenean (Klemm et al., 2005) eta aurrerago, Payen-ek berak, "zelulosa" termino bezala definituko zuen egitura hori (Iguchi et al., 2000; Klemm et al., 2005).

Zelulosa, naturan aurki daitekeen biopolimero ugariena da eta lurtean dagoen biomasa totalaren erdia baino gehiago suposatzen du (Jonas eta Farah, 1998; Nobles et al., 2001). Urtero, naturan bataz beste 10^{11} tona zelulosa sortzen dela estimatzen da (Hon, 1994; Kwok eta Wong, 2003). Egitura eta forma ezberdinetako zelulosa mota asko urteetan aztertuak izan dira, hala ere, oraindik ez daude ikerketa asko zelulosaren sintesiaren inguruan. Polimero natural berriztagarri hau, biodegradagarria da, eta

abantail ugari ditu, besteak beste, dentsitate baxua eta modulu eta erresistentzia altuak (Zadorecki eta Michell, 1989; Joly et al., 1996).

1.3.1. Zelulosaren egitura kimikoa

I.1. Irudian, zelulosaren egitura kimikoa aurkezten da eta bertan zelulosa kateak, D-anhidroglukosa ($C_6H_{11}O_5$) unitateen C1 eta C4 karbonoen 1,4- β -D-glikosidiko loturen bidez sortzen direla ikus daiteke. Zelulosa unitate bakoitzak aurkezten dituen hiru hidroxilo taldeek, hidrogeno zubi intramolekularrak sortzeko duten gaitasunaren ondorioz, lotura hauek zelulosaren metatze kristalinoari eta hainbat propietate fisiko-kimiko-mekanikoetan erabateko eragina dute, hala nola: ez-solugarria, kimikoki erresistentea eta mekanikoki trinkoa izatea (Williamson et al., 2002; John eta Thomas, 2008).

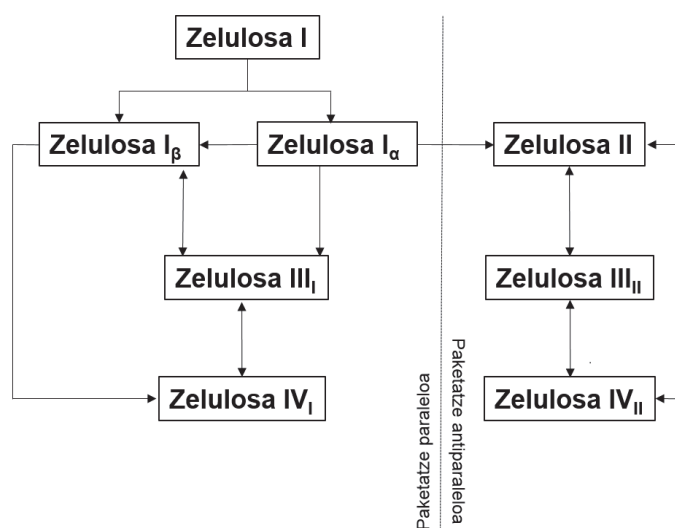


I.1. Irudia. Zelulosaren egitura.

Zelulosa kateak, zelulosa zuntz elementala sortzeko elkartzten dira eta hidrogeno zubien bidez mikrozuntzak osatzen dituzte. Mikrozuntzak, erdikristalinoak izan ohi dira, zonalde amorfo (ordenamendu gutxikoa) eta zonalde kristalino (ordenatua) ezberdinak tartekatua bereiz daitezke, proportzioaren arabera kristaltasun indize ezberdinak lortuz (Bhattacharya et al., 2008). Zelulosaren jatorri ezberdinak edota forma kristalino ezberdinak direla eta, sei polimorfismo ezberdin aurki daitezke (I, II, III_I, III_{II}, IV_I eta IV_{II}). Zelulosa egitura kristalino ezberdin hauek, beraien artean elkar bihur daitezke tratamendu kimiko eta termikoen bitartez **I.2. Irudian** azaltzen den bezalaxe.

Zelulosa I, ohiko zelulosaren egitura kristalinoa da eta beste egiturak lortzeko oinarria. Zelulosa honetan bi forma alomorfiko kristalino bizikide dira, I_{α} eta I_{β} nahaste bat bezala (VanderHart eta Atalla, 1984). Naturan, bi forma alomorfiko hauen proportzioa

zelulosaren jatorriaren arabera da. I_α fasea oinarrizko organismoetan ugariagoa izan ohi da, itxasbelar eta bakterio-zelulosa besteak beste eta I_β aldiz, landare eta zuhaitzetan ugariagoa (Rondeau-Mouro et al., 2003). I_α fase metaegonkorraren sorrera, kristalizazio prozesuan emandako tentsio edo deformazio puntualei atxiki izan zaio (Kataoka eta Kondo, 1998). Honez gain, α fasea lehen mailako hormetan ugariagoa dela ikusi da eta β fasea aldiz, bigarren mailako hormetan (Kataoka eta Kondo, 1998). Gainera, α fasea, metaegonkorra da eta β fasean eralda daiteke. I_α zelulosa, ez da egitura egonkorra (kate bakarrez osaturiko zelulosa triklinikoaren kristalografia simetrikoari dagokion fase metaegonkorra da) eta 260 °C-tan burutzen den prozesu termiko ez itzulgarri baten bidez I_β -n (bi kate paralelok osaturiko zelulosa monoklinikoa) bihur daiteke egonkorragoa izanik. Trantsizio hau, β fasearen egonkortasun termiko eta dentsitate handiagoa denarekin dago erlazionatua (Baker et al., 2000).



I.2. Irudia. Zelulosa polimorfismo ezberdinak lortzeko eraldaketa bideak.

Zelulosa II, oinarrizko zelulosaren (zelulosa I) merzerizazio tratamendu kimikoaz eta birsorketa bidez eraldatuz lortzen da (Tsuda eta Mukoyama, 1957). Zelulosa hau, energetikoki zelulosa I baino egonkorragoa denez, gertatzen den eraldaketa itzulezina da. Gainera, zelulosa honen ezaugarri nagusia zelda unitate monokliniko antiparaleloa da. Zelulosa III_I eta zelulosa III_{II} berriz, zelulosa I edo II-ren amonio eta beste hainbat aminen tratamenduen bitartez lortutako egitura da (Yatsu et al., 1986). Azken honen antolaketa, nahiz eta zelulosa II-ren antzekoa izan, zelulosa kateak paraleloki antolatutakoak ditu. Zelulosa egitura kristalino mota hau (zelulosa III), berez naturan aurkitzea zaila den arren, bakterio-zelulosaren biosintesian zenbait gehigarrien presentziaren ondorioz sintetizatu daiteke (Hirai et al., 1998). Hutino eta Sakurada-k, zelulosa IV, zelulosa III-ren modifikazio termikoz lortutako zelulosaren beste

polimorfismoa bezala definitu zuten (Hutino eta Sakurada, 1940). Kulshreshtha-k berriz, zelulosa IV-rako bi egitura bereizi zituen IV_I eta IV_{II}, jatorri ezberdinetako zelulosei burututako tratamendu termikoen bitartez lortzen direnak (Kulshreshtha, 1979).

I.3.2. Zelulosaren iturriak

Zelulosak aniztasun handia aurkezten du jatorriari dagokionean, izan ere, landareen zelulen osagai nagusia izateaz gain, itsasbelar, itsas animalietan, onddo eta bakterioek (mikroorganismoek) sintetizatuta ere aurki daiteke. Landare lignozelulosikoetatik eratorritako zelulosak, zeintzuetan horma zelularrean hemizelulosaz eta ligninaz inguratuta dauden batez ere, hainbat iturri desberdinetatik lortu daitezke (egurra, lastoa, hostoak, etab.) (Chirayil et al., 2014). Honez gain, zelulosa, itsasbelar askoren hormen egitura osagai nagusia da, baina espezie batetik bestera ezberdintasun nabarmenak aurkezten ditu egiturari dagokionean (Imai eta Sugiyama, 1998). *Valonia ventricosa*, esaterako, zelulosan oso aberatsa den itsasbelar familia ezagunenetakoa da (Baker et al., 2000). Onddoetatik eratorritako zelulosa, oraindik ikerkuntza mailan aurkitzen da. Onddo batzuen filamentoak gai baitira zelulosa mikrozuntzak ekoizteko (Brown et al., 1976). Bestetik, itsas animalien artean, *Tunicates* da zelulosa ekoizten dutenetan ezagunena. Bere zelulosak, ezaugarri morfologiko eta mikroestrutural oso bereziak ditu, batez ere landare zelulosarekin konparatuz kristaltasun indize oso altua, eta zelulosa I (I_{β}) forma alotropiko monoklinikoa aurkezten du (Samir et al., 2004). Mikroorganismoetatik sintetizatze berriz, genero ezberdinetako bakterioak erabiltzen dira: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* eta *Sarcina* besteak beste (Premjet et al., 2007).

Lan honetan, bakterio bidez sintetizatutako zelulosa erabili da. Zelulosa mota honek eta landareetatik eratorritako zelulosak egitura kimiko bera duten arren, propietate aldetik hainbat desberdintasun aurkezten ditu. Orokorrean, bakterioak sintetizatutakoak purutasun, polimerizazio maila eta kristaltasun indize handiagoa aurkezten du eta honek beste hainbat propietateetan ere eragina du, batez ere propietate mekanikoetan (Ul-Islam et al., 2012a).

I.3.3. Bakterio-zelulosa

BZ, bakterioek sintetizatzen duten zelulaz kanpoko polimeroa da. Nahiz eta, 1886ean J. Brown-ek zelulosaren ekoizpena deskubritu zuen, ez du XX. mendearen bigarren erdialdera arte bilakaera handirik jasan. Baina azken urteetan, bere kristaltasun indizea eta sare-egituragatik erakargarri bihurtu da hainbat aplikazioetarako, medikuntza arloan batez ere (Jonas eta Farah, 1998; Bielecki et al., 2002).

Aurretik adierazi moduan, BZ bakterio baten prozesu metabolikoaren ondoren lortutako produktua da eta *Zoogloe*, *Salmonella*, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* eta *Sarcina* bakterio generoek, besteak beste sintetizatzen dute (Dudman, 1959; Jonas eta Farah, 1998). Genero hauetatik eraginkorrena, *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinum* gisa birsailkaturikoa) Gram-negatibo (zeintzuek bi mintz lipidoen artean peptidoglikanozko horma zelularra mehe batez osaturiko egitura duten) bakterioak dira eta zelulosa sintetizatzeke mikroorganismo eredu gisa erabili dira. Espezie hau, ozpin, fruitu zuku, fruitu, etab.-en prozesu aerobikoetan aurkitua izan da (Klemm et al., 2001).

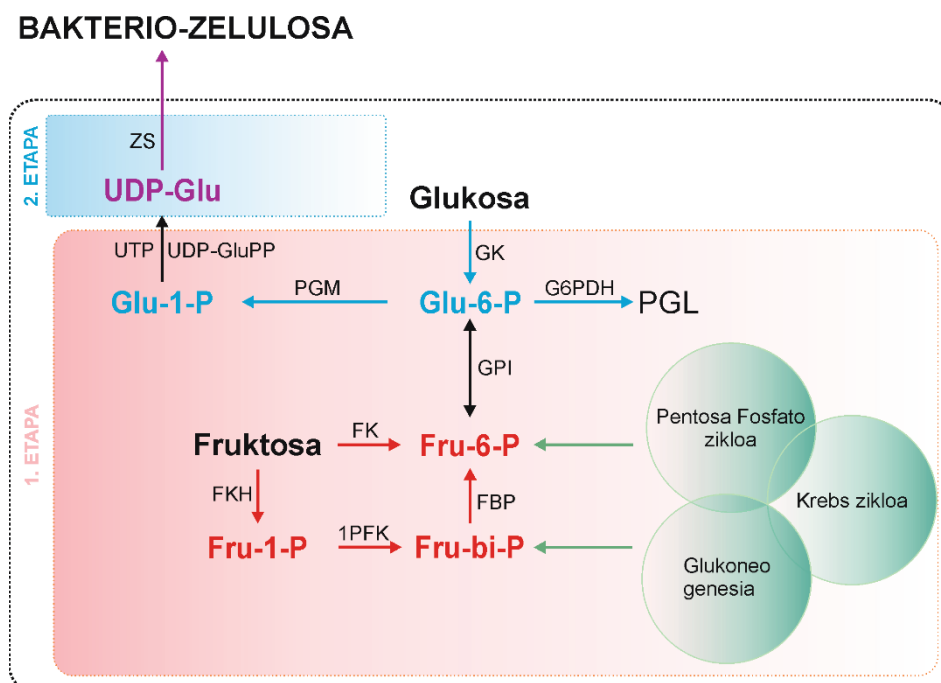
Azken urteetako hainbat lan, biopolimero honen sintesi-mekanismoan bideratu dira, baita egitura eta bere aplikazioan ere (Hirai et al., 1987; Czaja et al., 2006). Zelulosa honek, landareetatik eratorritako zelulosarekin aldentuz, egitura kimiko berdina izan arren, konformazioa zein propietate fisiko ezberdinak ditu (Jung et al., 2010a; Keshk eta Sameshima, 2006a). Bakterio-zelulosaren ezaugarri garrantzitsuenetako bat landare zelulosarekin aldentuz, bere purutasuna da, ez baita landare hormetan bezala hemizelulosaz eta ligninari atxikituta egoten (Bielecki et al., 2002). Gainera, zelulosa honek kristaltasun indize altua du (%60-a baino handiagoa); kristal horiek I_{α} eta I_{β} alomorfoz osaturik daude eta hauen arteko erlazioa mikroorganismo motaren eta ingurune baldintzen (karbono iturriak, biopolimero gehigarriak, tenperatura, etab.) arabera izan ohi da (Jonas eta Farah, 1998).

Lan honetan, *Gluconacetobacter* familiako bakterioa erabiliz sintetizaturiko zelulosa aztertu da. BZ-ren biosintesisirako, bi bidezidor anfiboliko garrantzitsu gertatzen dira *Gluconacetobacter* bakterioan: pentosa fosfatoen eta Krebs-en zikloak hain zuzen ere. Lehenak, karbohidratoen oxidazioan parte hartzen duen bitartean, bigarrenak azido organikoak oxidatzen ditu (Ross et al., 1991). *Gluconacetobacter* bakterioak, glizerol, zitrato eta Krebs zikloaren bitarteko substratuak beste batzuen artean erabiliz, glukoneogenesiaren bidez glukosa produzitzeko gai da. Horretarako, fosfato hexosak (fruktosa, manosa) glukosa-6-fosfatoan (Glu-6-P) bilakatu ditzazke zelulosa polisakaridoaren sintesisirako (Weinhouse eta Benziman, 1974).

1.3. Irudian, bakterioaren bidez lortutako zelulosaren ekoizpenerako prozesuaren irudia azaltzen da. Zelulosaren sintesia bi etapa nagusitan ematen da. Lehenengo etapan, karbono iturrien eraldaketa gertatzen da, zelulosa lortzeko erabiltzen den uridina difosfato glukosa (UDP-Glu) substratua lortuz eta bigarren etapan, zelulosa sortu eta hazkuntza ingurunean estrapatzen da (Ross et al., 1991; Bielecki et al., 2002; Chawla et al., 2009).

Lehen etapan, ingurunean aurkitzen den substratua (glukosa, fruktosa, etab.) mikroorganismoan sartzen denean hasten da. Glukosa karbono iturria, lehenik glukokinas (GK) entzimari esker fosforilatzen da glukosa-6-fosfato (Glu-6-P) bihurtuz; ondoren, fosfoglukomutasa entzimaren ekintzak (PGM) Glu-6-P glukosa-1-fosfato konposatuan (Glu-1-P) bilakatzen du. Hurrengo urratsean, UDP-Glu pirofosforilasa (UDP-GluPP) entzimak, Glu-1-P-tik abiatuz eta uridina trifosfatoaren (UTP) presentzian UDP-Glu bilakatzen du (Swissa et al, 1980). Honez gain, glukosa-6-fosfato isomerasa (GPI) entzimari esker Glu-6-P-aren isomerizazioa gertatzen da, fruktosa-6-fosfatoa (Fru-6-P) sortuz eta era berean, glukosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) entzimari esker fosfatoglukonolaktanoa (PGL) eratu ere. Fruktosaren bide metabolikoan, bi entzimek parte hartu dezakete: alde batetik, hexokinasa edo fruktokinasa (FK) entzimak fruktosa-6-fosfatoa (Fru-6-P) sintetizatzen du eta beste aldetik, fruktokinasa hepaticoa (FKH) fruktosa-1-fosfatoa (Fru-1-P), zein 1-fosfofruktokinasa (1PFK) entzimarekin fosforilatzen den fruktosa bifosfatoa (Fru-bi-P) eratuz (Adelman et al., 1967) eta baliteke, fruktosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) entzimak alderantzizko erreakzioaren bidez Fru-6-P sortzea.

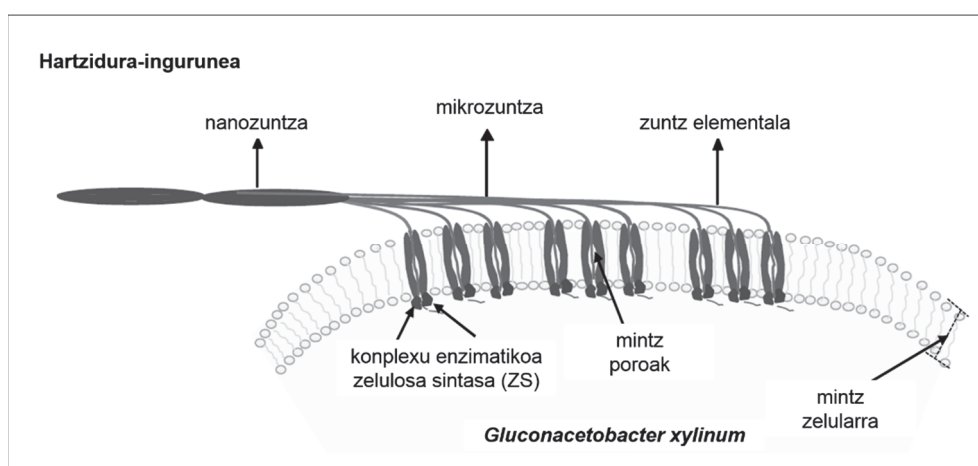
Bigarren etapan, lehendabizi glukosaren polimerizazioa gertatzen da eta jarraian, zelulosaren eskrezioa hazkuntza ingurunean zelulosa sintasa (ZS) entzimaren ekintzaren ondorioz (Ross et al., 1991; Han eta Robyt, 1998).



I.3.Irudia. Bakterio-zelulosaren sintesiaren bide metabolikoa.

I.4. Irudian, *Gluconacetobacter xylinum* bakterioaren BZ-ren produkzioaren azpielementu bakoitzaren paketatzea azaltzen da. Bakterio honek, orduko 108 glukosa

kate estruitzen dituzte bere azkenburu konplexuetatik (Brown et al., 1989). Mikroorganismoaren mintz zelularren gainazalean, 3,5 nm-ko poroak lerrokaturik aurkitzen dira eta hauei atxikiturik, mintz barnealdean, poro bakoitza inguratzen duen ZS konplexu entzimatikoa (glukosaren polimerizazioaren arduraduna) aurkitzen da (Marx-Firgini eta Pion, 1974; Klemm et al., 2005). Ingurunean, 1,5-3,5 nm diametroko eskreturiko kate linealak edo zuntz elementalak sortzen dira. Hauetariko, 10-etik 100-era bitarteko glukano kate lineal (zuntz elementala) elkartuz, 10-30 nm diametroko mikro-zuntzak eratzen dira (Haigler eta Benziman, 1982). Azkenik, hauetako bakoitza paraleloki paketatzen hasten da eta zuntzen artean gertatzen diren hidrogeno zubiak eta Van der Waals indarrei esker, 40-80 nm-ko diametroko eta 1-9 μm -tako luzerako nanozuntzak sortzen dira (Brett, 2000; Klemm et al., 2005).



I.4. Irudia. *Gluconacetobacter xylinum* bakteriotik zelulosa azpielementuen paketatzea.

Orokorrean, zelulosaren biosintesian eragiten duten faktoreen artean, hartzidura-ingurunea eta hartzidura-baldintza bereizten dira. Izan ere, bakterioen hazkuntzarako hartzidura-ingurunean karbonoa, nitrogenoa eta beste hainbat substratu izatea ezinbestekoa da. Horregatik, hurrengo ataletan, BZ-ren biosintesian eragiten duten faktoreen, hau da, ingurune konposizioaren eragina (karbono eta nitrogeno iturriak), hartzidura-baldintzak (estatikoa eta dinamikoa), gehigarriak eta beste faktore batzuen (bakterio-anduia, pH, tenperatura eta disolbaturiko oxigenoa) berrikuspen bibliografiko bat burutuko da.

I.3.4. Ingurune konposizioaren eragina

Hestrin eta Schramm-ek 1954-ean, bakterioetatik eratorritako zelulosaren azterketa burutu zuten lehenengotariakoak izan ziren. Hauek, Hestrin eta Schramm-ek HS deituriko ingurune definitu bat aurkeztu zuten, aurrerago ikerkuntza askotan erreferentzi gisa

erabiliko zena. Izan ere, BZ sintetizatzeke HS ingurune estandar komertziala erabiliena izan da. Erreferentzia ingurune honen konposizioa, 6,0-ko pH-an, %2 glukosa, %0,5 peptona, %0,5 legamia, %0,27 fosfato disodia eta %0,1115 azido zitrikoa izanik (Hestrin eta Scharmm, 1954). Baina, HS ingurunearen kostu altuak direla medio, azken urteetan BZ-ren ekoizpen ekonomikoagoak lortzeko asmoarekin, zelulosa etekin altuak ematen dituzten hartidura-ingurune alternatiboak aztertu dira, batez ere karbono eta nitrogeno iturri ezberdinen bideragarritasuna, beste aldagai batzuen artean.

Karbono iturriaren eragina

Azken urteetan, karbono iturri ezberdinak erabiliak izan dira *Gluconacetobacter* anduiarekin BZ-ren ekoizpena aztertzeko. Ikertutako karbono iturrien artean, gehien erabilia izan dena glukosa izan da batez ere arrazoi ekonomikoak direla eta. Orokorrean, glukosa hutsa erabiltzeak, desabantaila nagusi bat aurkezten du, honek azido glukonikoaren formazioa hobesten baitu, ingurunekeo pH jaitsiz, eta hori dela eta, BZ-ren ekoizpena murriztuz (Chawla et al., 2009). Horregatik, glukosa ordezkatzeko iturri ezberdinak ikertu izan dira, hala nola, sukrosa (Pourramezan et al., 2009), glizerola (Jung et al., 2010b), arabitola (Oikawa et al., 1995) eta manitola (Jonas eta Farah, 1998; Kim et al., 2006; Moosavi-Nasab eta Yousefi, 2011), BZ-ren etekina handitzen zela ikusiz. Gainera, badira azukre anitzak erabiltzen dituzten hainbat lan ere. Adibidez, Embuscado et al.-ek edo Dhaman et al.-ek, glukosa karbono iturria erabiltzeaz gain, azukre nahaste ezberdinak erabili zituzten eta glukosarekin aldentuz, etekin handiagoak lortu zituzten (Embuscado et al., 1994; Dahman et al., 2010).

Bestalde, beste autore batzuek, iturri berriztagarrietatik eratorritako substratu merkeagoak ikertu dituzte BZ-ren produkziarako. Hauen artean, melazazko erremolatxa (Dudman., 1959), molasazko azukre kanabera (Bae eta Shoda, 2004; Keshk eta Sameshima 2006a; Premjet et al., 2007) eta astigar jarabea (Zeng et al., 2011) aurkitzen dira, lortutako BZ produkzioa glukosarekin konparatuz handiagoa izanik. Honez gain, badira bibliografian fruitu hondakinetatik edota zukuetatik eratorritako karbono iturriak erabiltzen dituzten lanak, zeintzuek etekinean emaitza esanguratsuak ikusi zituzten; laranja zukua (Kurosumi et al., 2009), pinaburu azala (Retegi et al., 2010; Castro et al., 2011), *Aloe Vera* (Saibuatong eta Phisalaphong, 2010), oliba-urina (Gomes et al., 2013) eta koko ura (Budhiono et al., 1999), besteak beste. Ekoizpen handitze hau, ingurunean dauden elikagaien osagarriek dagokie (sulfuroak, nitrogeno organikoak, bitaminak, beste karbohidratoak, etab.) mikroorganismoen hazkuntza hobesten dutelarik (Hestrin eta Scharmm, 1954; Keshk eta Sameshima, 2006b; Premjet et al., 2007).

Nitrogeno iturriaren eragina

Nitrogeno iturriari dagokionez, BZ ekoizpenean legamia eta peptona dira normalean erabiltzen diren nitrogeno iturriak HS ingurunean. Orokorrean, *Gluconacetobacter* anduiarentzat beharrezkoa da nitrogenoa eta BZ-ren biosintesisirako funtsezko faktore da (Chao et al., 2001; Kim et al., 2006). Nitrogeno iturrien artean, legamia, peptona, kaseina, amonio sulfatoa eta triptona izan dira erabilienak (Kim et al., 2006; Ramana et al., 2000; Pourramezan et al., 2009; Panesar et al., 2009; Hungund eta Gupta, 2010; Coban eta Biyik, 2011), zeintzuek BZ produkzioan iturri eraginkorrak direla frogatu den.

1.3.5. Hartzidura-baldintza ezberdinak

Hartzidura, prozesu kataboliko (bizidunengan gertatzen diren erreakzio kimikoen multzoa) bat da, zeinetan gluzidoen eta proteinen degradazioa gertatzen den. Mota ezberdinetako hartzidurak dauden arren, bakterioek edo mikroorganismo ezberdinek eragindako hartzidurari, hartzidura azetiko deritza eta *Acetobacter* generoko bakterio aerobikoak (oxigenoaren presentzian) batik-bat ingurunean aurkitzen den alkohola azido azetikoan bilakatzen baitu.

BZ-ren ekoizpenerako, bi hartzidura-baldintza nagusi erabili izan dira: baldintza estatikoa eta dinamikoa besteak beste (Krystynowicz et al., 2002). Hartzidura-baldintza ezberdinekin egitura desberdinetako zelulosa lortzen da. Hala ere, azken urteetan gehien ikertua izan den hartzidura-baldintza estatikoa izan da. Baldintza honetan, etekin altuak lortzeaz gain, biosintetizaturiko mintzak aurkezturiko propietate termiko eta mekanikoak, kristaltasun indize altua eta beste hainbat propietatei esker ikerketa lan askotan erabili da (Caicedo et al., 2001; Czaja et al., 2004; Chawla et al., 2009).

Baldintza estatikoa

Aipatu denez, baldintza estatikoan zelulosa mintz forman sortzen da. Mikroorganismoen populazioa hazteko, hartzidura-ingurunean disolbatutako oxigenoa (DO) kontsumitzen da; denbora honetan mikroorganismoek zelulosa kantitate bat estruitzen dute ingurunean. Oxigeno kantitatea jaisten doan heinean, zelulosaren ekoizpena murrizten da eta ondorioz, airearekin kontaktuan (ingurune/aire interfasean) dauden mikroorganismoek soilik jarraitzen dute zelulosaren ekoizpen aktibitatearekin (Shirai et al., 1994; Kouda et al., 1997; Chao et al., 2001). Fase likidoan (ingurunean) aurkitzen diren bakterioak egoera letargian aurkitzen dira, eta berriz aktibatuta daitezke aurreragoko inguruneetan inokulu gisa erabiliz (Klemm et al., 2001).

Zelulosaren biosintesiaren lehen egunetan, ingurune gainazalean mintz mehe bat sortzen da bakterioa izpi ultramoreetatik babesten duena (Borzani eta Souza, 1995; Klemm et al., 2001). Zelulosa mintza, geruza ezberdinen gainjartzeaz eratzen da eta hartidura denbora aurrera doan heinean, mintz honen lodiera hazten da geruza berriak eratzen direlako (Klemm et al., 2001). Gutxi-gora-behera zazpi egunen buruan, ingurune gainazalean esekirik aurkitzen den zelulosa mintza eratzen da, eta honek, atmosferako oxigenoaren eta nutrienteen arteko hesi eraginkor bezala jarduten duen arren, zelulosa sortzen duten bakterioak arinki mantsoago hazten dira (Son et al., 2001). Zelulosaren ekoizpen maximoa lortzeko asmoarekin, BZ-aren biosintesian eragiten duten aldagai ezberdinak (ingurune konposizioa, kontzentrazio, pH-a, etab.) ikertuak izan dira.

Baldintza dinamikoa

Hartidura-baldintza dinamikoan ostera, *pellets*, esfera-itxurako edo itxura aglomeratu irregularra duten zelulosa egiturak lor daitezke zazpi egunetan. Baldintza dinamikoa, BZ produkzioarako azkarragoa izan daiteke eta honegatik, komertzialki erabiliagoa da estatikoa baino (Watanabe et al., 1998). Hala ere, agitazioaren eraginez hainbat desabantail gerta daitezke. Izan ere, glukosaz osaturiko ingurunean mugimenduak eraginda, glukosa substratua azido glukonikoan bilakatzen da, nutrienteak kontsumituz eta honen ondorioz, etekina gutxitzen da (Yang et al., 1998; Park et al., 2004). Lan batzuetan efektu hau bakterio-andui ezberdinekin (*Acetobacter aceti subsp.*, *Acetobacter xylinum* BCR5, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum subsp sucrofermentans* BPR2001 eta *Acetobacter sp.* A9) (Johnson eta Neogi, 1989; Yang et al., 1998; Son et al., 2001) edo karbono iturria (fruktosa eta arto likorea) aldatuz murriztu izan dute (Joseph et al., 2003).

I.3.6. Gehigarrien eragina

Hainbat lanetan hartidura-ingurunean gehigarriak isuriz, BZ-ren sintesian izan dezaketen eragina aztertu izan dute (Naritomi et al., 1998; Chao et al., 2001; Park et al., 2003; Joseph et al., 2003; Cheng et al., 2009; Yan et al., 2008; Lu et al., 2011; Ruka et al., 2013). Esate baterako, Park et al.-ek edota Naritomi et al.-ek ere, etanola bolumenean %1-ean gehitzean BZ etekina handitzen zuela baieztatu zuten (Naritomi et al., 1998; Park et al., 2003). Gauza bera ikusi zuten Lu et al.-ek alkohol ezberdinekin (metanola, n-butanola, etilen glikola, n-propanola, glizerola eta manitola) efektua ikertu zutenean, edozein erabilia zelulosaren produkzioa estimulatzeko zutela ikusi zutelarik (Lu et al., 2011).

Bestalde, Chao et al.-ek, uretan disolbagarriak diren polisakaridoek izan zezaketen eragina BZ-aren ekoizpenean (agar, xantana eta dextrona) aztertu zuten eta polisakarido guztiek ez zutela BZ etekina hobetzen ondorioztatu zuten (Chao et al., 2001). Gainera, beste hainbat gehigarri erabili izan dira, poliakrilamidak (PA) eta sodio alginatoa esate baterako, BZ-ren etekina handitzeko (Joseph et al., 2003; Cheng et al., 2009).

Badira hainbat lan uretan disolbagarriak ez diren gehigarriak erabiltzen dituztenak, hala nola, poli-3-hidroxitiratoa (PHB) (Ruka et al., 2013) eta horma anitzeko karbono nanohodiak (MWCNT) (Yan et al., 2008; Chen et al., 2009), inkubazio prozesu hasieran gehiturik, BZ-ren biosintesi prozesuan nanozuntzen paketatzean tartekatzen direnak eta BZ mintz hibridoak lortuz.

I.3.7. Beste faktore batzuk

Aurreko faktoreez gain, BZ biosintesian eragin dezaketen beste faktore batzuk ere kontutan hartu beharrekoak dira: bakterio-anduia, pH-a, temperatura eta disolbaturiko oxigenoa.

BZ sintetizatzeako bakterio-anduia ugari existitzen dira eta hauen artean, *Gluconacetobacter* generoa aurkitzen da. Bakterio genero honetan, zelulosa produzitzeko eraginkorrak (etekin altuak lortuz) diren andui ugari aurkitzen dira (Jonas eta Farah, 1998; Sokollek et al., 1998; Klemm et al., 2001; Klemm et al., 2005; Dellaglio et al., 2005; Cheng et al., 2009; Castro et al., 2012). Gainera, hainbat iturritatik isolatu izan dira; hala nola, fruitu zukuetatik, loreak, hartzitutako elikagaiak, (Dellaglio et al., 2005; Alauzet et al., 2011) eta ozpina (Sokollek et al., 1998).

pH-a kontrolatzea ezinbestekoa da zelulosaren produkzioan, bakterio-andui gehienak zelulosa ekoizteko pH optimoa 4-tik 6-ra aurkitzen da (Fontana et al., 1991; Masaoka et al., 1993). *Gluconacetobacter sp.* bakterioak esaterako, 4 eta 7 bitarteko pH-an produzitu dezake (Galas et al., 1999; Iguchi et al., 2000). Baldintza estatikoan azido glukonikoen, azetikoen edo laktikoen metatzeak, pH optimoa jaisten dute, eta ondorioz etekinean eragin dezake (Hestrin eta Schramm, 1954; Fiedler et al., 1989; Joris et al., 1990; Fontana et al., 1991; Masaoka et al., 1993; Ishikawa et al., 1995; Jonas eta Farah, 1998; Coban eta Biyik, 2011; Jahan et al., 2012). Bestalde, bibliografiaren arabera, BZ-ren produkzio maximoa lortzeko temperatura optimoa 25-30 °C bitartean aurkitzen da, eta hau, bakterio-anduiaren arabera izango da (Hestrin eta Schramm, 1954; Roman et al., 1989; Masaoka et al., 1993; Jonas eta Farah, 1998; Pourramezan et al., 2009; Dahman et al., 2010; Jahan et al., 2012). Honez gain, aipatzekoa da *Gluconacetobacter*

bakterio-anduia aerobikoa izanagatik, hots, zelulosa produzitzeko oxigenoa beharrezkoa duela (Hestrin eta Scharmm, 1954).

I.4. BAKTERIO-ZELULOSAN OINARRITUTAKO BIONANOKONPOSITEAK

Gaur egun, eskala nanometrikodun ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) materialen inguruan interes handia piztu da eta ezagutza handia lortzen ari da, materialen zientzia eta ingeniartzaren ezagutza arloan. Lerro honetan, nanokonpositeek bultzada handia jasan dute hainbat ikerketa, industria eta aplikazioetan. Nanokonpositeak, material konposatuak edo fase anitzeko materialak dira, zeinak faseetako bat edo gehiagok nanometro dimentsioak dituen. Hainbat antolaketa aurkez ditzaketen arren, arruntena matrize moduan jokatzen duen solido batean eta eskala nanometrikoa duen fase bat edo gehiago dispersaturiko sistema bat da. Material hauen propietate mekaniko, elektrikoa, termiko, optiko, elektrokimiko eta katalitikoa, besteak beste, osagaiak banaka dituzten propietateekiko desberdinak dira eta material konposite arruntak baino hobekiago matrizean dispersaturiko fasearen gainazal eta bolumen erlazio altuari esker (Roy et al., 1986; Kumar et al., 2009; Azeredo et al., 2009).

Nanokonposite polimerikoa, fase jarrai batek (matrize polimerikoa) eta bere dimentsiotako bat gutxienez maila nanometrikoa ($1\text{-}100 \text{ nm}$) duen fase dispersatua (indargarria) osatzen dute. Matrize bezala aurkitzen den material polimerikoa, indargarria inguratu eta eusten du. Aurretik aipatu moduan, nanokonpositeek propietate paregabeak aurkezten dituzte, baina propietate hauek lortzeko ezinbestekoa da polimero eta indargarrien artean itsasgarritasun ona izatea. Indargarri gisa era askotako materialak erabiliak izan diren arren, beraien tamainaren arabera isodimentsionalak (partikula esferikoak), bi dimentsio nanometrikokoak dituztenak (karbono nanotutuak, zelulosa mikrozuntzak, bakterio zelulosa) eta dimentsio bakarrekoak (nanobuztina) aurki daitezke (Alexandre eta Dubois, 2000).

Polimero nanokonposatuak metodo ezberdinekin sintetizatu daitezke, polimeroaren jatorriaren eta osagai ezberdinen arabera. Orokorrean, BZ-n oinarritutako bionanokonpositeak prestatzeko bi metodo erabiltzen dira, *in-situ* eta *ex-situ* edo impregnazio teknikak hain zuzen ere.

I.4.1. *In-situ* BZ bionanokonpositeen prestakuntza

Teknika honetan, polimero ezberdinak hartxidura-ingurunean gehitzen dira. BZ-ren egitura sintetizatzen den heinean, ingurunean aurkitzen diren polimeroak zelulosa nanozuntzen artean harrapaturik gera daitezke, hiru dimentsioko zelulosa sarearen

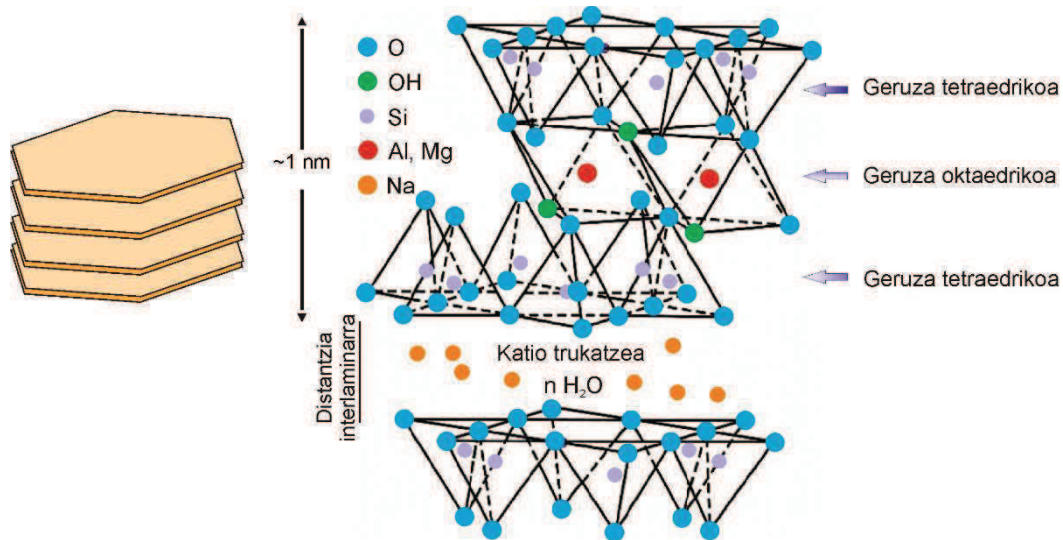
parte bilakatuz (Yano et al., 2008; Yan et al., 2008; Chen et al., 2009; Grande et al., 2009; Cheng et al., 2009; Saibuatong eta Phisalaphong, 2010; Ul-Islam et al., 2012a; Ruka et al., 2013).

Ruka et al.-ek, uretan disolbagarria ez den poli-3-hidroxibutiratoa (PHB) erabiliz, prestaturiko bionanokonpositearen morfologian eta kristaltasunean eragina izan zuela ikusi zuten (Ruka et al. 2013) eta Grande et al.-ek aldiz, ingurunean uretan disolbagarria den almidoiarekin, kristaltasunean ez zuten eraginik ikusi (Grande et al., 2009). Badira ordea, beste hainbat adibide, non polimero motaren arabera, zelulosaren biosintesian eragiten dutenak ere (Yano et al. 2008). Honez gain, baliteke zelulosa sintetizatzen doan heinean ingurunean dispersaturik aurkitzen den polimeroa hauspeatzea eta honen ondorioz, zelulosa sarean barneratzeko aukera gutxiago izatea. Horregatik, badira adibide batzuk, non teknika hau erabiltzeko baldintza dinamikoa edota diska-biratzaleekin hornitutako ontziak erabiltzea hobesten duten (Yan et al., 2008).

In-situ teknika BZ-an oinarrituriko mintz hibridoak eratzeko ere erabilia izan da, BZ-ak fase jarrai edo matrize gisa jokatuz. Esaterako, Yan eta lankideek, horma anitzeko karbono nanohodiak (MWCNTs) gehituz, nanohodiak nanozuntzen artean harrapaturik aurkitzen zirela konprobatu zuten (Yan et al., 2008).

Lan honetan, *in-situ* teknikaren bitartez silikato laminarren familiako den montmorillonita (MMT) nanobuztina gehitu da hartzidura ingurunera, BZMMT mintz hibridoak lortzeko. MMT-an oinarritutako nanokonpositeen propietate paregabeek bultzaturik eta matrize polimerikoei eskaintzen dizkieten indargarri, egonkortasun termiko, suarekiko erresistentzia, iragazkortasuna dela eta, matrize ezberdinekin konbinaturik erabili izan da hainbat lanetan (Ul-Islam et al., 2012a). **I.5. Irudian**, Montmorillonitaren (MMT) egituraren eskema azaltzen da. Ikusten denez, material hauek xaflen edo lamina pilaketan oinarritzen dira. Lamina bakoitza silikatoz osaturiko egitura tetraedrikoa eta aluminaz edo magnesiaz osaturiko egitura oktaedrikoa duten geruzak elkartzean sortzen da. Geruzako Al^{3+} eta Mg^{2+} ioiak beste batzuekin ordezka daitezke, esaterako, Al^{3+} -a, Mg^{2+} edo Fe^{2+} -rengatik eta Mg^{2+} -a, Li^{+} -rengatik, alkali ioi positiboekin balatzeatu behar diren karga negatiboa sortuz, katioi trukatzailerik ahalmenaz (CEC) ezagutzen dena. Geruza oktaedriko bat eta bi geruza tetraedrikok eraturiko unitateari lamina deritza. Hortaz, MMT-aren kasuan, lamina bakoitza osaturiko geruza zenbakien arabera, egitura 2:1 motakoa da, hau da, hiru geruzez osaturik: bat oktaedrikoa eta bi tetraedrikoak, **I.5. Irudian** ikusten den bezala (Pinnavaia eta Beall, 2000). Honez gain, silikato xaflen artean, aurkitu daitekeen espazioa lamina arteko distantzia edo galeria deitzen da (Hackman eta Hollaway, 2006). Distantzia hau

nanometrikoa izaten da. Lamina artean polimero kateak tartekatuz, egitura interkalatuak lor daitezke, lamina arteko distantziaren handitze bat ematen delarik, aldiz, polimero kateak lamina artean tartekatzean lamina antolaketa suntsitzen badute, egitura esfoliatu bat lortzen da (Alexandre eta Dubois, 2000).



1.5. Iruia. Montmorillonita nanobuztinaren egitura.

1.4.2. *Ex-situ* BZ bionanokonpositeen prestakuntza

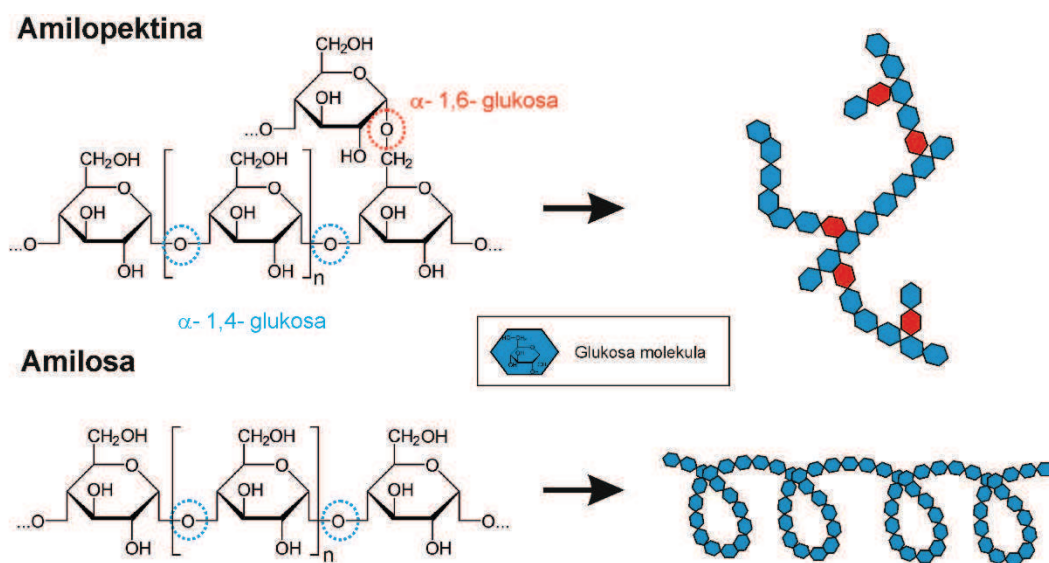
Teknika honetan, BZ-a mintza edo filma polimeroarekin inpregnatzean datza nanokonpositea lortuz. Izan ere, teknika honen bidez BZ-ak 3D-ko egitura mantentzen du, eta hau, abantaila izan daiteke, bere propietate fisiko-kimiko eta mekanikoak paregabeak baitira. Bionanokonpositeak lortzeko gehien erabili izan den BZ, hartxidura-baldintza estatikoaren bidez lorturikoa izan da, bere film morfologia dela eta (Maneerung et al., 2008). *Ex-situ* estrategia, BZ-ri polimero bat gehitzeko erabilia izan da (Evans et al., 2003; Nakayama et al., 2004; Yoon et al., 2006; Hong et al., 2006; Maneerung et al., 2008; Liu et al., 2011; UI-Islam et al., 2012b; Pinto et al., 2013).

Azken urteetan, erabili diren polimero ezberdinen artean, adibidez, kitosanoa (CH), gelatina eta poliuretanoa aurkitzen dira. BZ-CH bionanokonpositeak prestatzean, BZ-ren propietate mekanikoak hobetzea lortu zuten (UI-Islam et al., 2012b); gelatinarekin biomedikuntzan erabilgarriak izan zitezkeen bionanokonpositeak prozesatu zituzten (Nakayama et al., 2004; Hong et al., 2006) eta poliuretanoarekin, ur-xurgapen murrizketa eta egonkortasun termikoa hobetuak dituzten materialak lortu zituzten (Pinto et al., 2013). Bestalde, teknika hau mintz hibridoak lortzeko ere erabili izan da. Aukera anitzak aurkitzen dira bibliografian; paladioa, karbono nanohodiak eta montmorillonita (MMT) erabiliz bionanokonpositeak produzitu dira (Evans et al., 2003; Yoon et al., 2006; UI-

Islam et al., 2012b). UI-Islam et al. eta Liu et al.-ek, BZ-MMT konpositeak prestatu zituzten, lehenengoek, bakterioen aurkako propietatea, zaurien orbaintzea eta farmakoen garraio propietateak zituen BZ-an oinarritutako materiala lortu zuten, eta bigarrenek aldiz, propietate mekaniko eta suarekiko erresistentzia hobetzea lortu zuten (Liu et al., 2011; UI-Islam et al., 2012b).

Almidoi termoplastikoa (ATP)

Lan honetan, bakterio-zelulosa/almidoi termoplastiko eta bakterio-zelulosa-MMT/almidoi termoplastiko bionanokonpositeak prestatu dira *ex-situ* teknikaren bitartez. Almidoia, glukosaz oinarrituriko biopolimero naturala da eta nanokonposite biodegradagarriak eratzeko hautagai egokia kontsidera daiteke. Almidoia, hainbat landareetatik lortu daiteke eta berez granulua itxura du non 1-100 μm -ko partikula tamaina duten (Sugih et al., 2009) eta granulu hauen forma eta tamaina almidoi jatorriaren arabera da (Buckow et al., 2009). Almidoia, bi polisakarido ezberdinez osaturik dago: amilosa eta amilopektina, eta bi hauen arteko erlazioa ere almidoiaren jatorriaren arabera da. Amilosak 1,4- α -glukosa loturaz osaturiko egitura lineala du (**I.6. Irudia**), zati kristalino eta amorfoarekin. Nahiz eta, amilosa katearen luzera beti berdina ez izan, landarearen arabera delako, orokorrean, 102 eta 104 unitate izan ohi ditu (Ponstein, 1990). Amilopektinaren egiturari dagokionez, kristalinoa da eta bere egituran, 1,4- α -glukosaren 20-30 bitarteko unitate, 1,6- α -glukosarekin adarkatuta azaltzen dira (Moore et al., 1997; Flieger et al., 2003). Normalean, 104-105 bitarteko glukosa unitatez osaturik dago (Ponstein, 1990).

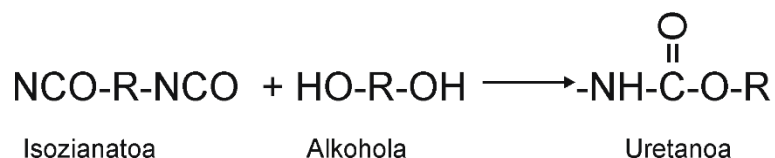


I.6. Irudia. Almidoi osagaien egitura kimikoa.

Orokorrean, jatorrizko almidoiak %20-40 bitarteko kristaltasun indizea aurkezten du eta material erdi-kristalino bezala kontsidera daiteke (Whistler et al., 1984). Zonalde amorfoa, amilosa eta adarkaturik aurkitzen den amilopektinaz osaturik dago. Aldiz, almidoiaren izaera kristalino nagusia amilopektinaren kate labur-adarkatuek osatzen dute, zeinak ~5 nm luzerako helize bikoitza itxura duen. Berezko almidoia, hauskorra eta hidrofilikoa denez, desegokitzak jo daiteke hainbat aplikaziotarako. Honez gain, almidoiaren fusio puntua deskonposizio termikoko temperatura baino altuagoa da, ahalmen termiko ahulak emanez (Wang et al., 2003). Almidoia ur hotzean disolbaezina da, baina oso higroskopikoa izanagatik ura era itzulgarri batean xurgatzeko gai da. Izan ere, almidoi granulua urarekin batera berotzean, barrualdean hidrogeno loturak puskatzen dira eta ondorioz, almidoia gelatinizatzen hasten da, almidoi termoplastikoa lortuz (ATP) (Van Soest et al., 1996). Honez gain, ATP-a prozesatzeko plastifikatzailearen (ura, glizerola, sorbitol, etab.) presentzia ezinbestekoa da, beti ere temperaturaren eta ebakidura indarren laguntza izanik (Wang et al., 2003; Vilpoux eta Avèrous, 2004).

Uretan oinarritutako poliuretanoa

Poliuretanoak (PU) aplikazio ugarietan erabiltzen diren polimero familia zabala osatzen dute, beraien propietate tarte zabala errektiboen izaerarekiko, errektiboen erlazio molarrarekiko eta sintesi baldintzen menpekota izanik (Randall eta Lee, 2003; Thomson, 2004; Chattopadhyay eta Raju, 2007; Wang et al., 2013; Hao et al., 2016). Poliuretanoen sintesian parte hartzen duten errektibo garrantzitsuenen artean, poliola, diisozianatoa eta kate luzatzailea aurkitzen dira. **I.7. Irudian** erakusten denez, polimero kate nagusia, isozianato eta hidroxilo funtzio-taldeen arteko poliadizio errektzioaren ondorioz uretano funtzio-taldez sintetizatzen da. Erreakzio honetan, isozianato mota ezberdinak eta hidroxilo funtzio-taldea duten molekula ugari erabil daitezkeenez, oso propietate ezberdineko poliuretanoak sintetiza daitezke, aplikazio ezberdinetan erabiltzeko aukera paregabea eskainiz, automobilgintza industrian edota eraikuntzan, besteak beste (Hepburn, 1992; Noble, 1997; Frisch, 1998; Wojcik, 1998; Vermette et al., 2001).



I.7. Irudia. Isozianato eta alkoholaren arteko errektzioa uretano funtzio-taldea sintetizatzen.

Poliuretanoen artean, segmentatuen egitura, segmentu zurrin (SZ) eta segmentu malguez (SM) osaturik dago, blokeko kopolimeroak eratuz. Hauen formulazioa eta egitura kimikoa kontuan izanik, fase zurrin eta malgu edukiera desberdinak lor daitezke, eta propietateak aztertzeko garaian kontuan hartu beharreko parametroak dira. Izan ere, morfologiak, propietate fisiko-kimikoak, termikoak eta mekanikoak, menpekotasun handia aurkezten baitute aldagai hauekiko (Korley et al., 2006; Saralegi et al., 2012).

Ohiko poliuretanoak hidrofobikoak dira eta disolbatzaile organikoetan disolbatzen dira. Azken urteetan, ingurumenarekiko kontzientzia dela eta, barne emultsiogileen (normalean ionikoa) gehikuntza medio, uretan dispertsagarriak diren poliuretano (UPU) sistemen ikerketa bultzatu da, disolbatzaile organikoen erabilera murriztuz eta konposatu organiko hegazkorren sorkuntza ekidinez (Helling eta Rusell, 2009; Lee et al., 2006). Barne emultsiogilea, lotura kobalentez elkartutako errektiboa, kate polimerikoaren parte da (Lee et al., 2006), dispertsioaren formazio etapan sortzen diren partikulen egonkortasuna bermatuz. Horrela, dispertsio etapan ura gehitzen denean, talde ionikoak partikularen gainazalean kokatuko dira, partikularen azala eratuz (Son et al., 1998; Lee eta Kim, 2009). Aldiz, domeinu hidrofobikoak partikularen erdialdean kokatuko dira, nukleoa osatuz (Bullerman et al., 2013). Ingurumenarekiko aurkezten dituzten abantailaz gain, poliuretano ur dispertsioak hainbat propietateen konbinaketa interesgarria aurkezten dute, hala nola, solido eduki altua eta masa molekular altua, liskatasun baxua, sukoitasun eza eta giro tenperaturan filmak sortzeko gaitasuna (Bao et al., 2006; Li et al., 2014). Horretaz gain, ohiko poliuretanoen antzeko propietateak dituzten filmak lortu daitezke, hala nola erresistentzia kimiko ona, malgutasun altua eta gainazal askorekiko itsaskortasuna (Barikani et al., 2007), hainbat aplikazioetan erabiliz, itsasgarri, gainestaldura, mintz eta aplikazio biologikoetan, besteak beste (Barrère eta Landfester, 2003; Nanda eta Wicks, 2006; Lee et al., 2006).

I.5. BAKTERIO-ZELULOSAREN APLIKAZIOAK

Mikroorganismoetatik eratorritako zelulosak dituen propietateak (purutasun eta kristaltasun indize altuak, dentsitate baxua, etab.) bultzaturik, BZ-n oinarritutako bionanokonpositeek aplikazio ezberdinak izan ditzakete, ehungintzan, papergintzan, elikagai industrian, produktu farmazeutiko komertzialetan, elektronika arloan eta hondakinen tratamenduetan besteak beste (Johnson eta Neogi, 1989; Farah, 1990; Fontana et al., 1990; Vandamme et al., 1998; Budhiono et al., 1999; Czaja et al., 2006; Chawla et al., 2009;). Izan ere, BZ material naturala ez-toxikoa kontsidera daitekeenez, hautagai ona da elikagaien industrian eta biomedikuntza aplikazioetarako. Propietate

hauek bultzaturik, BZ-n oinarritutako bionanokonpositeak aplikazio ezberdinetarako aztertu dira. Ondoren, aplikazio hauen berrikuspen bibliografiko orokor bat azaltzen da.

Aplikazio industrialak

BZ aplikazio eremu ugarian erabili daitekeen arren, gaur egun soilik aplikazio komertzial batzuk existitzen dira. Elikagaien prozesaketan agente egonkortzaile edo lodigarri bezala erabili daiteke, "nata de coco" edo koko esne-gaina izenarekin ezaguna dena (Vandamme et al., 1998; Budhiono et al., 1999). Honez gain, ehungintza industrian (hots, modan) erabiltzeko hainbat ikerketa burutu dira, larrua ordezkatzeko. Gainera, BZ-k aurkezten dituen propietate mekanikoen ondorioz, konpositeak prestatzeko erabili izan da. Papergintzan, esaterako, hartidura ingurunean paper partikulak edota glukosa fosfata gehituz (Basta eta El-Saied, 2009). BZ mintza, baita propietate optoelektroniko eta akustikoak dituzten dispositiboak lortzeko ere erabili da (Nogi et al., 2005). Sony Konpainiak eta Ajinomoto-k lehen audio hizlari diagramak sortu zituen (Yamanaka et al., 1989; Nishi et al., 1990).

Biomedikuntzan aplikazioak

BZ biomedikuntza arloan erabilia izan da urteetan zehar. Erabileren artean, zaurien bakterioen aurkako estaldura, ehunen birsorkuntza eta biobateragarritasun propietateak gehitzeko, osagai polimeriko eta ez polimerikoekin BZ bionanokonpositeak prestatu dira biomedikuntzarako hainbat aplikazioetan (Kim et al., 2010). Material konposite ezberdin hauek, aurkezten dituzten ur-xurgapen gaitasuna, biodegradagarritasuna eta bakterioen kontrako propietateak garrantzizko ezaugarriak izan daitezke, zaurien estalkietan, hodi-kardiobaskularraren ordezkapenean eta errektuntza tratamenduetan hain zuzen ere (Maneerung et al., 2008; Kim et al., 2010; UI-Islam et al., 2011; UI-Islam et al., 2013). Izan ere, BZ-ak odol-hodi ehun ingeniartzan, ikuspegi erakargarria izan dezakete gaixotasun baskularrak dituzten pertsonengan (Bäckdahl et al., 2006). Suediako Arterio konpainia, BZ-rekin lorturiko odol-hodi artifizialak probatzen eta komertzializatzen ari da (Millon eta Wan, 2006). Gainera, gaur egun medikuntza aplikazioetarako erabiltzen diren hainbat produktu komertzializatzen dira: Biofill®, Bioprocess eta Gengiflex® apositu bezala erabiltzen direlarik (Johnson eta Neogi, 1989; Farah, 1990).

Beste aplikazio batzuk

Elektronika alorrean, konduktibitate elektronikoko eta argia igortzen dituzten dispositiboetako mintzak garatu dira, zelulosaren egituraren metalak txertatuz (Wanichapichart et al., 2002; Take et al., 2002; Evans et al., 2003; Mukai et al., 2006;

Yan et al., 2008; Li et al., 2009; Shen et al., 2009; Sun et al., 2010; Müller et al., 2012; Jiang et al., 2012). BZ mintzak, disoluzioen banaketa prozesuetan erabil zitezkeela frogatua izan da, behi-azienda serum disoluzioen (Krystynowicz et al., 2002; Wanichapichart et al., 2002), poliolen banaketan, (Matsuoka et al., 1996), fruitu zukuen argitzean (Pandey et al., 2005), etanol-ura nahasketen ebaporazioa (Duvey et al., 2005), fruituko osagai aromatikoen ebaporazioan (Shibazaki et al., 1993), dialisian (Sokolnicki et al., 2006) eta gas iragazkortasunean erabili izan dira (Carreira et al., 2011). Ikerturiko kasu guztietan, BZ mintzak osagaiekiko selektibitatea aurkeztu zuten.

1.6. BIBLIOGRAFIA

- Adelman, R. C., Ballard, F. J., Weinhouse, S. (1967). *Purification and properties of rat liver fruktokinase*. Journal of Biological Chemistry, 242, 3360-3365.
- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., Marchandin, H. (2011). *Gluconobacter as well as Asaia species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria*. Journal of Clinical Microbiology, 48, 3535-3942.
- Alexandre, M., Dubois, P. (2000). *Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials*. Material Science and Engineering: R: Reports, 28, 1-63.
- Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., Wood, D., Williams, T. G., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H. (2009). *Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers*. Journal of Food Science, 74, 31-35.
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., Gatenholm, P. (2006). *Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells*. Biomaterials, 27, 2141-2149.
- Bae, S., Shoda, M. (2004). *Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium*. Biotechnology Progress, 20, 1366-1371.
- Baker, A. A., Helbert, W., Sugiyama, J., Miles, M. J. (2000). *New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the I_α crystal phase at near atomic resolution*. Biophysical Journal, 79, 1139-1145.
- Bao, L. H., Lan, Y. L., Zhang, S. F. (2006). *Synthesis and properties of waterborne polyurethane dispersions with ions in the soft segments*. Journal of Polymer Research, 13, 507-514.
- Barikani, M., Ebrahimi, M. V., Mohaghegh, S. M. S. (2007). *Preparation and characterization of aqueous polyurethane dispersions containing ionic centers*. Journal of Applied Polymer Science, 104, 3931-3937.
- Barrère, M., Landfester, K. (2003). *High molecular weight polyurethane and polymer hybrid particles in aqueous miniemulsion*. Macromolecules, 36, 5119-5125.
- Basta, A. H., El-Saied, H. (2009). *Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper*. Journal of Applied Microbiology, 107, 2098-2107.
- Bhattacharya, D., Germinario, L. T., Winter, W. T. (2008). *Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse*. Carbohydrate Polymers, 73, 371-377.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2002). *Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Weinheim: Wiley- VCH Verlag, 5, 37-90.
- Borzani, W., Souza, S. J. (1995). *Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media*. Biotechnology Letters, 17, 1271-1272.

- Brett, C. T. (2000). *Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall*. International Review of Cytology, 199, 161-169.
- Brown, R. M., Willison, J. H., Richardson, C. L. (1976). *Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73, 4565-4569.
- Brown, A. J. (1886). *On an acetic ferment which forms cellulose*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 49, 432-439.
- Brown, R. M. (1989). In book: Cellulose: Structural and Functional Aspects. Eds.: Kennedy, J. F., Phillips, G. O., Williams, P. A., Ellis Horwood, United States. Chapter 16: Bacterial cellulose, 145-151.
- Buckow, R., Jankowiak, L., Knorr, D., Versteeg, C. (2009). *Pressure-temperature phase diagrams of maize starches with different amylose contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 11510-11516.
- Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., Iguchi, M. (1999). *Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system*. Carbohydrate Polymers, 40, 137-143.
- Bullermann, J., Friebel, S., Salthammer, T., Spohnholz, R. (2013). *Novel polyurethane dispersions based on renewable raw materials-stability studies by variations of DMPA content and degree of neutralisation*. Progress in Organic Coatings, 76, 609-615.
- Caicedo, L. A., De Franca, F. P., Lopez, L. (2001). *Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática*. Revista Colombiana de Química, 30, 155-162.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. (2011). *Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose*. Bioresource Technology, 102, 7354-7360.
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. (2011). *Structural characterization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter swingsii sp. from Colombian agroindustrial wastes*. Carbohydrate Polymers, 84, 96-102.
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I., Gañán, P. (2012). *Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of Gluconacetobacter genus*. Carbohydrate Polymers, 89, 1033-1037.
- Chao, Y., Mitarai, M., Sugano, Y., Shoda, M. (2001). *Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50-L airlift reactor*. Biotechnology Progress, 17, 781-785.
- Chattopadhyay, D. K., Raju, K. V. S. N. (2007). *Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications*. Progress in Polymer Science, 32, 352-418.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal, R. S. (2009). *Microbial cellulose: fermentative production and applications*. Food Technology and Biotechnology, 47, 107-124.
- Chen, D., Liu, T., Zhou, X., Tjiu, W. C., Hou, H. (2009). *Electrospinning fabrication of high strength and toughness polyimide nanofiber membranes containing multiwalled carbon nanotubes*. The Journal of Physical Chemistry B, 113, 9741-9748.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., Demirci, A. (2009). *Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis*. Journal of Biological Engineering, 3, 1754-1611.
- Chirayil, C. J., Mathew, L., Thomas, S. (2014). *Review of recent research in nano cellulose preparation from different lignocellulosic fibers*. Reviews on Advanced Materials Science, 37, 20-28.
- Coban, E. P., Biyik, H. (2011). *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose*

- synthesis by Acetobacter lovaniensis HBB5*. African Journal of Biotechnology, 10, 5346-5354.
- Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, R. (2004). *Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture*. Cellulose, 11, 403-411.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, R. M. (2006). *Microbial cellulose-the natural power to heal wounds*. Biomaterials, 27, 145-151.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K. E., Kalis, M. (2010). *Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 1647-1659.
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelbeen, K., Janssens, D., Marzotto, M. (2005). *Description of Gluconacetobacter swingsii sp. nov. and Gluconacetobacter rhaeticus sp. nov., isolated from Italian apple fruit*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2365-2370.
- Dudman, W. (1959). *Cellulose production by Acetobacter acetigenum and other Acetobacter spp.* Journal of General Microbiology, 21, 312-326.
- Duvey, V., Pandey, L. K., Saxena, C. (2005). *Pervaporative separation of ethanol/water azeotrope using a novel chitosan-impregnated bacterial cellulose membrane and chitosan-poly(vinil alcohol) blends*. Journal of Membrane Science, 251, 131-136.
- Embuscado, M. E., Marks, J. S., BeMiller, J. N. (1994). *Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by Acetobacter xylinum*. Food Hydrocolloids, 8, 407-418.
- Evans, B. R., O'Neill, H. M., Malyvanh, V. P., Lee, I., Woodward, J. (2003). *Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells*. Biosensors and Bioelectronics, 18, 917-923.
- Farah, L. F. X. (1990). *Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby, artificial skin graft and its use*. United State, Patent 4912049
- Fiedler, S., Fuessel, M., Sattler, K. (1989). *Production and application of bacterial cellulose: I. A survey on state of research and investigations concerning fermentation kinetics*. Zentralblatt fuer Mikrobiologie, 114, 473-484.
- Flieger, M., Kantoravá, M., Prell, A., Řezanka, T., Votruba, J. (2003). *Biodegradable plastics from renewable sources*. Folia Microbiologica, 48, 27-44.
- Fontana, J. D., De Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., de Souza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A., Farah, L. F. (1990). *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 24-25, 253-264.
- Fontana, J. D., Franco, V. C., de Sousa, S. J., Lyra, I. N, de Sousa, A. M. (1991). *Nature of plant stimulators in the production of Acetobacter xylinum ("tea fungus") biofilm used in skin therapy*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 28, 341-351.
- Frisch, K. (1998). In book: *60 years of polyurethanes*. Eds.; Kresta, J. E., Eldred, E. W., Technomic Publishing, Lancaster, PA.
- Galas, E., Krystynowicz, A., Tarabasz-Szymanska, L., Pankiewicz, T., Rzycka, M. (1999). *Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis*. Acta Biotechnologica, 19, 251- 260.
- Gomes, F. P., Silva, N. H. C. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Duarte, M. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Freire, C. S. R. (2013). *Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sacchari using dry olive mill residue*. Biomass and Bioenergy, 55, 205-211.
- Grande, C. J., Fernando G. Torres, Clara M. Gomez, Omar P. Troncoso, Josep Canet-Ferrer, Juan Martinez-Pastor,. (2009). *Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites*. Materials Science and Engineering: C, 29, 1098-1104.
- Hackman, I., Hollaway, L. (2006). *Epoxy-layered silicate nanocomposites in civil engineering*. Composite Part A: Applied Science and Manufacturing, 37, 1161-1170.
- Haigler, C. H., Benziman, M. (1982). In book: *Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, structure and degradation*. Ed.: Brown, R. M., New York,

- Plenum Press. *Chapter 14: Biogenesis of Cellulose I Microfibrils Occurs by Cell-Directed Self-Assembly in Acetobacter xylinum*, 273-297.
- Han, N. S., Robyt, J. (1998). *The mechanism of Acetobacter xylinum cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane*. Carbohydrate Research, 313, 125-133.
- Hao, H., Shao, J., Deng, Y., He, S., Luo, F., Wu, Y., Li, J., Tan, H., Li, J., Fu, Q. (2016). *Synthesis and characterization of biodegradable lysine-based waterborne polyurethane for soft tissue engineering applications*. Biomaterials Science, 4, 1682-1690.
- Helling R. K., Rusell D. A. (2009). *Use of life cycle assessment to characterize the environmental impacts of polyol production options*. Green Chemistry, 11, 380-389.
- Hepburn, C. (1992). In book: *Polyurethane elastomers*. Ed.: Springer Netherlands.
- Hestrin, S., Schramm, M. (1954). *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. Biochemistry Journal, 58, 345-352.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., Takaku, F. (1987). *A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the Eph gene*. Science, 238, 1717-1720.
- Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H., Horii, F. (1998). *In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy*. Cellulose, 5, 201-213.
- Hon, D. N. S. (1994). *Cellulose: a random walk along its historical path*. Cellulose, 1, 1-25.
- Hong, L., Wang, Y. L., Jia, S. R., Huang, Y., Gao, C., Wan, Y. Z. (2006). *Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route*. Materials Letter, 60, 1710-1713.
- Hungund, B. S., Gupta, S. G. (2010). *Improved production of bacterial cellulose from Gluconacetobacter persimmonis GH-2*. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 2, 127-133.
- Hutino, K., Sakurada, I. (1940). *On the existence of a fourth modification of the cellulose*. Naturwissenschaften, 28, 577-578.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000). *Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts*. Journal of Materials Science, 35, 261-270.
- Imai, T., Sugiyama, J. (1998). *Nanodomains of I_β and I_α cellulose in algal microfibrils*. Macromolecules, 31, 6275-6279.
- Ishikawa, A., Matsuoka, T., Tsuchida T., Yoshinaga, F. (1995). *Increase in cellulose production by sulfoguanidine-resistant mutants derived from Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59, 2259-2263.
- Jahan, F., Kumar, V., Rawat, G., Saxena, R. K. (2012). *Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167, 1157-1171.
- Jiang, G., Qiao, J., Hong, F. (2012). *Application of phosphoric acid and phytic acid-doped bacterial cellulose as novel proton-conducting membranes to PEMFC*. International Journal of Hydrogen Energy, 37, 9182-9192.
- John, M. J., Thomas, S. (2008). *Biofibres and biocomposites*. Carbohydrate Polymers, 71, 343-364.
- Johnson, D. C., Neogi, A. N. (1989). *Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose*. United States, 4863565.
- Joly, C., Kofman, M., Gauthier, R. J. (1996). *Polypropylene/cellulosic fiber composite: chemical treatment of the cellulose assuming compatibilization between the two materials*. Journal of Macromolecule Science A: Pure and Applied Chemistry, 33, 1981-1996.
- Jonas, R., Farah, L. F. (1998). *Production and application of microbial cellulose*. Polymer Degradation and Stability, 59, 101-106.

- Joris, K., Billiet, F., Drieghe, S., Brack, D., Vandamme, E. (1990). *Microbial production of β -1,4-glucan*. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, 55, 1563-1566.
- Joseph, G., Rowe, G. E., Margaritis, A., Wan, W. (2003). *Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by Acetobacter xylinum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78, 964-970.
- Jung, H. I., Lee, O. M., Jeong, J. H., Jeon, Y. D., Park, K. H., Kim, H. S., Son, H. J. (2010a). *Production and characterization of cellulose by Acetobacter sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 486-497.
- Jung, H. I., Jeong, J. H., Lee, O. M., Park, G. T., Kim, K. K., Park, H. C., Son, H. J. (2010b). *Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from Acetobacter sp. V6 cultured in shake flasks*. Bioresource Technology, 101, 3602-3608.
- Kataoka, Y., Kondo, T. (1998). *FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation*. Macromolecules, 31, 760-764.
- Keshk, S., Sameshima, K. (2006a). *The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 291-296.
- Keshk, S., Sameshima, K. (2006b). *Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture*. Enzyme and Microbial Technology, 40, 4-8.
- Kim, S. Y., Kim, J. N., Wee, Y. J., Park, D. H., Ryu, H. W. (2006). *Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 131, 705-715.
- Kim, J., Cai, Z., Chen, Y. (2010). *Biocompatible bacterial cellulose composites for biomedical application*. Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine, 1, 011006.
- Klemm, D., Schumann, D., Uhardt, U., Marsch, S. (2001). *Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery*. Progress in Polymer Science, 26, 1561-1603.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., Bohn, A. (2005). *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material*. Angewandte Chemie International Edition, 44, 3358-3393.
- Korley, L. T. J., Pate, B. D., Thomas, E. L., Hammond, P. T. (2006). *Effect of the degree of soft and hard segment ordering on the morphology and mechanical behavior of semicrystalline-segmented polyurethanes*. Polymer, 47, 3073-3082.
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1997). *Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 83, 371-376.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S. (2002). *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 29, 189-195.
- Kulshreshtha, A. K. (1979). *A review of the literature on the formation of cellulose IV, its structure, and its significance in the technology of rayon manufacture*. The Journal of The Textile Institute, 70, 13-18.
- Kumar, A. P., Depan, D., Tomer, N. S., Singh, R. P. (2009). *Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization-trends and future perspectives*. Progress in Polymer Science, 34, 479-515.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., Nakamura, Y. (2009). *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693*. Carbohydrate Polymers, 76, 333-335.
- Kwok, A. C. M., Wong, J. T. Y. (2003). *Cellulose synthesis is coupled to cell cycle progression at G(1) in the dinoflagellate cryptophyte cryptomonas*. Plant Physiology, 131, 1681-1691.

- Lee, H. T., Wu, S. Y., Jeng, R. J. (2006). *Effects of sulfonated polyol on the properties of the resultant aqueous polyurethane dispersions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 276, 176-185.
- Lee, S. K, Kim, B. K. (2009). *High solid and high stability waterborne polyurethanes via ionic groups in soft segments and chain termini*. Journal of Colloid and Interface Science, 336, 208-214.
- Li, X., Chen, S., Hu, W., Shi, S., Shen, W., Zhang, X., Wang, H. (2009). *In situ synthesis of CdS nanoparticles on bacterial cellulose nanofibers*. Carbohydrate Polymers, 76, 509-512.
- Li, Y., Noordover, B. A. J., Van Benthem, R. A. T. M., Koning, C. E. (2014). *Property profile of poly(urethaneurea) dispersions containing dimer fatty acid-, sugar- and amino acid-based building blocks*. European Polymer Journal, 59, 8-18.
- Liu, X. Z., Liu, Z. L., Jiang, Z. M., Zhang, C. Z. (2011). *Preparation method of artificial endocranium*. China, Patent 102000357.
- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., Sun, B. (2011). *Effects of alcohols on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum 186*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, 2281-2285.
- Maneerung, T., Tokura, S., Rujiravanit, R. (2008). *Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing*. Carbohydrate Polymers, 72, 43-51.
- Marx-Figini, M., Pion, B. G. (1974). *Kinetic investigations of biosynthesis of cellulose by Acetobacter xylinum*. Biochimica et Biophysica Acta, 338, 382-393.
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993). *Production of cellulose from glucose by Acetobacter xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 75, 18-22.
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., Yoshinaga, F. (1996). *A synthetic medium for bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60, 575-579.
- Millon, L. E., Wan, W. K. (2006). *The polyvinyl alcohol-bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 79, 245-253.
- Moore, B., Palmquist, D. E., Seemann, J. R. (1997). *Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco, snapdragon, and parsley*. Plant Physiology, 115, 241-248.
- Moosavi-Nasab, M., Yousefi, A. (2011). *Biotechnological production of cellulose by Gluconacetobacter xylinus from agricultural waste*. Iranian Journal of Biotechnology, 9, 94-101.
- Mukai, M., Tatsumi, D., Matsumoto, T. (2006). *Evaluation of bacterial cellulose membrane for fuel cells*. Polymer Preprints, 54, 6300-6305.
- Müller, D., Mandelli, J. S., Marins, J. A., Soares, B. G., Porto, L. M., Rambo, C. R., Barra, G. M. B. (2012). *Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PANI)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC)*. Cellulose, 19, 1645-1654.
- Nakayama, A., Kakugo, A., Gong, J. P., Osada, Y., Takai, M., Erata, T., Kawano, S. (2004). *High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose*. Advanced Functional Materials, 14, 1124-1128.
- Nanda, A. K., Wicks, D. A. (2006). *The influence of the ionic concentration, concentration of the polymer, degree of neutralization and chain extension on aqueous polyurethane dispersions prepared by the acetone process*. Polymer, 47, 1805-1811.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1998). *Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 85, 598-603.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S. (1990). *The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2: Improvement of the mechanical properties of sheet and their*

- applicability to diaphragms of electro-acoustic transducer*. Journal of Material Science, 25, 2997-3001.
- Noble, K. L. (1997). *Waterborne polyurethanes*. Progress in Organic Coatings, 32, 131-136.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D. K., Brown, R. M. (2001). *Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase?*. Plant Physiology, 127, 529-542.
- Nogi, M., Handa, K., Nakagaito, A. N., Yano, H. (2005). *Optically transparent bionanofiber composites with low sensitivity to refractive index of the polymer matrix*. Applied Physics Letters, 87, 243110.
- Oikawa, T., Morino, T., Ameyama, M. (1995). *Production of cellulose from Darabitol by Acetobacter xylinum KU-1*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59, 1564-1565.
- Pandey, L. K., Saxena, C., Duvey, V. (2005). *Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane*. Separation and Purification Technology, 42, 213-218.
- Panesar, P. S., Chavan, Y. V., Bera, M. B., Chand, O., Kumar, H. (2009). *Evaluation of Acetobacter strain for the production of microbial cellulose*. Asian Journal of Chemistry, 21, 99-102.
- Park, J. K., Jung, J. Y., Park, Y. H. (2003). *Cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol*. Biotechnology Letter, 25, 2055-2059.
- Park, J. K., Hyun, S. H., Jung, J. Y. (2004). *Conversion of G. hansenii PJK into non-cellulose producing mutants according to the culture condition*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 9, 383-388.
- Pinnavaia, T. J., Beall, G. W. (2000). In book: *Polymer-Clay Nanocomposites*. Ed.: John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Pinto, E. R. P. Barud, H. S., Polito, W. L., Ribeiro, S. J. L., Messaddeq, Y. (2013). *Preparation and characterization of the bacterial cellulose/polyurethane nanocomposites*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 114, 549-555.
- Ponstein, A. S. (1990) *Starch synthesis in potato tubers*. PhD thesis. University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Pourramezan, G. Z, Raoyaei, A. M., Qezelbash, Q. R. (2009). *Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by Acetobacter sp. 4B-2*. Biotechnology, 8, 150-154.
- Premjet, S., Premjet, D., Ohtani, Y. (2007). *The effect of ingredients of sugar cane molasses on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum ATCC 10245*. Fiber, 63, 193-199.
- Ramana, K. V., Tomar, A., Singh, L. (2000). *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, 245-248.
- Randall, D., Lee, S. (2003). In book: *The polyurethanes book*. Ed.: Wiley-VCH. London, United Kingdom.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Gañan, P., de la Caba, K., Mondragon, I. (2010). *Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships*. Cellulose, 17, 661-669.
- Roman, M., Franzosi, G., Seves, A., Sora, S. (1989). *Study of the production of cellulose gel and cellulose by Acetobacter xylinum*. Cellulose Chemistry and Technology, 23, 217-223.
- Rondeau-Mouro, C., Bouchet, B., Pontoire, B., Robert, P., Mazoyer, J., Buléon, A. (2003). *Structural features and potential texturising properties of lemon and maize cellulose microfibrils*. Carbohydrate Polymers, 53, 241-252.
- Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991) *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. Microbiological Review, 55, 35-58.
- Roy, R., Roy, R. A., Roy, D. M. (1986). *Alternative perspectives on "quasi-crystallinity": non-uniformity and nanocomposites*. Materials Letters, 4, 323-328.
- Rudin, A., Choi, P. (2013). In book: *The Elements of Polymer Science and Engineering (Third Edition)*. Ed.: Academic Press Elsevier. Chapter 13: *Biopolymers*, 521-535.

- Ruka, D. R., Simon, G. P., Dean, K. M. (2013). *In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate*. Carbohydrate Polymers, 92, 1717-1723.
- Saibuatong, O., Phisalaphong, M. (2010). *Novo aloe vera-bacterial cellulose composite fillm from biosynthesis*. Carbohydrate Polymers, 79, 455-460.
- Samir, M. A. S. A., Alloin, F., Sanchez, J. Y., Dufresne, A. (2004). *Cross-linked nanocomposite polymer electrolytes reinforced with cellulose whiskers*. Macromolecules, 37, 4839-4844.
- Saralegi, A., Rueda, L., Fernandez-d'Arlas, B., Mondragon, I., Eceiza, A., Corcuera M. A. (2012). *Thermoplastic polyurethanes from renewable resources: effect of soft segment chemical structure and molecular weight on morphology and final properties*. Polymer International, 62, 106-115.
- Shen, W., Chen, S., Shi, S., Li, X., Zhang, X., Hu, W., Wang, H. (2009). *Adsorption of Cu (II) and Pb (II) onto diethylenetriamine-bacterial cellulose*. Carbohydrate Polymers, 75, 110-114.
- Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F., Usuda, M. (1993). *Bacterial cellulose membrane as separation medium*. Journal of Applied Polymer Science, 50, 965-969.
- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S., Ogawa, M., Nishi, N., Tokura, S. (1994). *Biosynthesis of a novel polysaccharide by Acetobacter xylinum*. International Journal Biological Macromolecules, 16, 297-300.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., Hammes, W. P. (1998). *Description of Acetobacter oboediens sp. nov. and Acetobacter pomorum sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 935-940.
- Sokolnicki, A., Fisher, R. J., Harrah, T. P., Kaplan, D. L. (2006). *Permeability of bacterial cellulose membranes*. Journal of Membrane Science, 272, 15-27.
- Son, S. H., Lee, H. J., Kim, J. H. (1998). *Effects of carboxyl group's dissociation and dielectric constant on particle size of polyurethane dispersions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 133, 295-301.
- Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., Lee, S. J. (2001). *Optimization of fermentation condition for the production of bacterial cellulose by a newly isolated Acetobacter sp. A9 in shaking culture*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 33, 1-5.
- Sugih, A. K., Drijfhout, J. P., Picchioni, F., Janssen, L. P. B M., Heeres, H. J. (2009). *Synthesis and properties of reactive interfacial agents for polycaprolactone-starch blends*. Journal of Applied Polymer Science, 114, 2315-2326.
- Sun, D., Yang, J., Li, J., Yu, J., Xu, X., Yang, X. (2010). *Novel Pd-Cu/bacterial cellulose nanofibers: preparation and excellent performance in catalytic denitrification*. Applied Surface Science, 256, 2241-2244.
- Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H., Benizman, M. (1980). *Intermediary steps in in Acetobacter xylinum cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant*. Journal of Bacteriology, 143, 1142-1150.
- Take, H., Yamanaka, S., Ishihara, M., Yoshino, K. (2002). *Anode performance of pyrolyzed bacterial cellulose in secondary lithium-ion batteries and the effect of added metal phthalocyanines*. Japanese Journal of Applied Physics, 41, 3137-3139.
- Thomson, T. (2004). In book: *Polyurethanes as specialty chemicals: principles and applications*. Ed.: CRC Press, Massachusetts, USA.
- Tsuda, Y., Mukoyama, S. (1957). *Effect of mercerization on the lateral order distribution of cellulose*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 30, 271-273.
- Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J. H., Park, J. K. (2011). *Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose*. Korean Journal of Chemical Engineering, 28, 1736-1743.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012a). *Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification*. Carbohydrate Polymers, 88, 596-603.

- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012b). *Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, 89, 1189-1197.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Khattak, W. A., Park, J. K. (2013). *Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: novel wound dressing material with antibacterial properties*. Cellulose, 20, 589-596.
- Van Soest, J. J. G., De Wit, D., Vliegenthart, J. F. G. (1996). *Mechanical properties of thermoplastic waxy maize starch*. Journal of Applied Polymer Science, 61, 1927-1937.
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P. (1998). *Improved production of bacterial cellulose and its application potential*. Polymer Degradation and Stability, 59, 93-99.
- VanderHart, D. L., Atalla, R. H. (1984). *Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR*. Macromolecules, 17, 1465-1472.
- Vermette, P., Griesser, H. J., Laroche, G., Guidoin, R. (2001). *Biomedical applications of polyurethanes (Tissue engineering intelligence unit)*. Landes Bioscience. Texas, USA.
- Vilpoux, O., Avèrous, L. (2004). In book: In Technology, Use and Potentialities of Latin American Starchy Tubers. Ed.: Cereda, M. P., Vilboux, O., Sao Paulo. *Chapter 18: Starch-based plastics*, 521-553.
- Wang, Y. L., Truong, V. D., Wang, L. (2003). *Structural and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis*. Carbohydrate Polymers, 52, 327-333.
- Wang, Z., Hou, Z., Wang, Y. (2013). *Fluorinated waterborne shape memory polyurethane urea for potential medical implant application*. Journal of Applied Polymer Science, 127, 710-716.
- Wanichapichart, P., Kaewnopparat, S., Buaking K., Puthai, W. (2002). *Characterization of cellulose membranes produced by Acetobacter xylinum*. Journal of Science and Technology, 24, 855-862.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998). *Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture*. Cellulose, 5, 187-200.
- Weinhouse, H., Benziman, M. (1974). *Regulation of hexose phosphate metabolism in Acetobacter xylinum*. Biochemical Journal, 138, 537-542.
- Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Paschall, B. F. (1984). In book: *Starch: chemistry and technology (Second Edition)*. New York: Academic, 1-718.
- Williamson R. E., Burn J. E., Hocart C. H. (2002). *Towards the mechanism of cellulose synthesis*. Trends in Plant Science, 7, 461-467.
- Wojcik, R. T. (1998). In book: *Polyurethane Coatings: From raw materials to end-products*. Ed.: Technomic Publishing Company, Incorporated, 1-348.
- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M. (1997). *The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus Gluconacetobacter to the generic level*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 1244-1251.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Michuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M. (1989). *The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose*. Journal of Materials Science, 24, 3141-3145.
- Yan, Z., Chen, S., Wang, H., Wang, B., Jiang, J. (2008). *Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture*. Carbohydrate Polymers, 74, 659-665.
- Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. R., Kim, Y. S. (1998). *Cellulose production by Acetobacter xylinum BRC5 under agitated condition*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 85, 312-317.
- Yano, S., Maeda, H., Nakajima, M., Hagiwara, T., Sawaguchi, T. (2008). *Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles*. Cellulose, 15, 111-120.

- Yatsu, L. Y., Calamari, T. A., Benerito, R. R. (1986). *Conversion of cellulose I to stable cellulose III*. Textile Research Journal, 56, 419-424.
- Yoon, S. H., Jin, H. J., Kook, M. C., Pyun, Y. R. (2006). *Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes*. Biomacromolecules, 7, 1280-1284.
- Zadorecki, P., Michell, A. J. (1989). *Future prospects for wood cellulose as reinforcement in organic polymer composites*. Polymer Composites, 10, 69-77.
- Zeng, X., Small, D. P., Wan, W. (2011). *Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum BPR 2001 from maple syrup*. Carbohydrate Polymers, 85, 506-513.

II. Atala

MATERIALAK ETA TEKNIKA ESPERIMENTALAK

II. MATERIALAK ETA TEKNIKA ESPERIMENTALAK

Atal honetan, bakterio-zelulosaren sintesian eta bionanokonpositeen prestaketan erabili diren materialak aurkezten dira. Honez gain, hauek karakterizatzeko erabilitako teknika eta baldintza ezberdinak ere azaltzen dira. Honela, analisi fisiko-kimiko, termiko, mekaniko, morfologikoa, *in vitro* erantzun zelularra, iragazkortasuna eta biodegradagarritasun azterketan erabili diren baldintza esperimentalak azaltzen dira.

II.1. MATERIALAK

Zelulosa laginak, *Gluconacetobacter medellinensis* bakterioa erabiliz laborategian sintetizatu dira. Bakterio-anduia, ozpin saldatik isolatu da eta Medellin-eko Pontificia Bolivariana Unibertsitateko “*New Materials Research*” taldeak hornitua izan da (Castro et al., 2012). Bakterioen hazkuntzarako, bi hartidura-ingurune prestatu dira. Alde batetik, pinaburu hondakin solidoetan oinarrituriko (P) ez-ohiko ingurunea eta bestetik, Hestrin eta Schramm (HS) ingurune estandarra eta erreferentzia gisa erabili dena (Hestrin eta Schramm, 1954). Hortaz, P ingurunea prestatzeko, pinaburu azala, azukre kanabera eta Panreac etxeko azido azetikoa ($C_2H_4O_2$) erabili dira. HS ingurune estandarra, Sigma Aldrich etxeko D-Glukosa ($C_6H_{12}O_6$, $\geq \%99,0$), legami-aterakina ($\geq \%89,0$), sodio hidrogeno fosfata (Na_2HPO_4 ; $\geq \%99,0$), azido zitrikoa ($C_6H_8O_7$; $\geq \%99,0$) eta Panreac etxeko peptonarekin ($\geq \%85,0$) prestatu dira.

Nanokarga inorganikoei dagokionez, Nanocor Inc. (Nanomer PGV) konpainiak hornitutako eraldatu gabeko montmorillonita (MMT) nanobuztina erabili da, zeinek 145 ± 10 meq/100 g nanokargako katioi trukatzeko ahalmena (CEC) duen.

Almidoi termoplastikoa (ATP) lortzeko, Sigma Aldrich etxeko arto almidoia (masan %73 amilopektina eta %27 amilosa) eta Panreac etxeko glizerol ($\geq \%99,0$) plastifikatzailea erabili dira.

Uretan oinarrituriko poliuretanoaren (UPU) sintesirako, arto azukretik eratorritako politrimetileno eter glikola (PTMEG $1400 \text{ g x mol}^{-1}$), segmentu malgu (SM) erdikristalino bezala erabili da, Covestro etxeak hornituriko isoforona diisozianatoa (IPDI) eta Sigma-Aldrich etxeak hornituriko azido 2,2-bis(hidroximetil)propionikoa (DMPA), trietilamina (TEA) eta 1,3-propanodiola (PD) erabili dira.

II.2. KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA

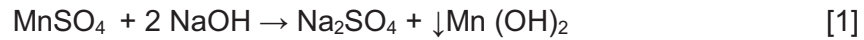
II.2.1. Inguruneen azukre eta oinarrizko analisisia

P eta HS inguruneen azukre analisisia egiteko, hau da, sakarosa, fruktosa, glukosa, maltosa eta maltotriosa azukreen kontzentrazioak ($\text{g} \times \text{L}^{-1}$) determinatzeko eraginkortasun handiko kromatografia likidoa (HPLC) erabili da. Horretarako, bonba isokratikoa, zutabeentzako konpartimentu termostatizatu eta errefrakzio indize detektagailuarekin hornituriko Perkin Elmer etxeko ekipoa erabili delarik. Azukreen bereizketa $40\text{ }^\circ\text{C}$ -tan egin da, 5 mm-ko Brownlee Amino Analitiko ($100 \times 4,6\text{ mm}$) zutabe batean, $1\text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ -ko abiadurarekin, azetonitrilo:ura (75:25) fase garraiatzaile gisa erabiliz. Laginak, $0,45\text{ }\mu\text{m}$ -ko poro dimentsioa duten zelulosa azetato filtroekin iragazi ondoren, 20 mL lagin ekipoa injektatu dira. Azukreen identifikazioan eta kuantifikazioan alde zurretik eginiko kalibrazioak erabili dira.

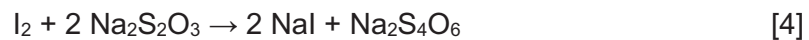
Inguruneen oinarrizko karbono, hidrogeno eta nitrogeno (CHN) analisisia, EA 3000 (Eurovector) analizatzailea erabiliz burutu da. Laginaren 4-6 mg, ezta inu kapsula batean kokatzen dira oinarrizko analizatzailearen barnean, eta ondoren, erre egiten da. Errekuntzan sortzen diren produktuak, helio gas eramalearen bidez garraiatzen dira zutabe kromatografiko bateraino, eta bertan, bereizketa egiten da. Azkenik, eroankortasun termikoko detektagailu batek elementu bakoitzaren seinalea igortzen du, hasierako laginarekiko emaitza ehunekotan adieraziz.

II.2.2. Disolbaturiko oxigeno edukia

Organismo gehienek hazkuntzarako, ingurunean oxigenoa egotea ezinbestekoa da. Horregatik, disolbaturiko oxigenoaren (DO) edukia aztertzea aspektu garrantzitsua da, ingurunean zelulosa sintetizatzen duten mikroorganismoek, inkubazio denboran kontsumitzen duten oxigenoaren garapena ezagutzeko. Oxigeno edukia *Winkler* metodoaz determinatu da. BZ sintetizaturiko hartidura-ingurune eta baldintzetan, denbora ezberdinetan lagin kantitate bat hartu eta ontzi esmerilatu (125 mL) batean sartu dira. Lagin honi, 1 mL sulfato manganoso, ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $35\text{ g} \times 100\text{ mL}^{-1}\text{ H}_2\text{O}$) gehitu eta irabiatu ondoren potasio ioduro soluzio alkalino baten 1 mL (15 g KI eta $35\text{ g NaOH} \times 100\text{ mL}^{-1}\text{ H}_2\text{O}$) gehitzen dira. Oxidazio-erredukzio erreakzioen ondorioz hauspeakin marroi bat eratzen da, non hauspeatutako kantitatea ingurunean disolbaturik dagoen oxigenoarekiko menpekoa den. Ondoren, 1 mL azido sulfuriko kontzentratua gehitzen da eta ingurunean sortu den hauspeakina berriz disolbatzen da, iodora oxidatuz. Oxidazio-erredukzio erreakzioen ondorioz [1-3] sorturiko iodoa egonkorra da.



Erreakzioan lorturiko iodoaren balorazioaz *DO* determinatzen da. Lorturiko soluzio homogeneoaren 100 mL tiosulfato sodiko ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0125 N) soluzio batekin baloratzen dira. Adierazle bezala almidoia erabiliko da (3-5 mL, 1 g almidoi eta 5 mg $\text{HgI}_2 \times 500 \text{ mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}$), sorturiko ioduroak almidoiarekin erreakzionatzen duenean urdin kolore biziko konplexua eratzen baitu.



Balorazioan erabilitako tiosulfato sodiko disoluzioaren mililitroak, ingurunearen litro batetan aurkitzen diren oxigeno miligramoen berdina izanik ($1 \text{ mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 1 \text{ mg O}_2 \times \text{L}^{-1}$).

II.2.3. Etekina

Hartzidura-inguruneen etekina neurtzeko, inkubazio bukaeran lorturiko BZ laginak pisatu (g) eta erabilitako bolumenarekiko (L) ($\text{g} \times \text{L}^{-1}$)-tan adierazi da. Aldi berean buruturiko bost hartzidura-prozesuren etekina neurtu da eta batz bestekoa determinatu da.

II.2.4. Polimerizazio-maila

Sintetizaturiko zelulosa lagin ezberdinen polimerizazio-maila (*PM*) liskatasun neurketaren bitartez kalkulatu da, ASTM D1795-96 araudiaren arabera (ASTM, 1996). Horretarako, Ubbelholde liskatasun neurgailu kapilarra erabili da. Lehendabizi, disoluzio txuria prestatu behar da (1. disoluzioa). Horretarako, 25 mL ur destilatu eta 25 mL kobre (II) etilendiamina (CED) nahastu dira eta disoluziora 2-3 kobre elektrolitiko makiltxo bota ondoren, N_2 atmosfera inertean irabiatu dira nahasketa homogeneoa lortu arte. Bestalde, 2. disoluzioa prestatzeko 125 mg zelulosa lagin, 50 mL disoluzioan (25 mL ur destilatu eta 25 mL CED) disolbatu dira eta 2-3 kobre elektrolitiko makil disoluziora bota ondoren bi orduz atmosfera inertean (N_2) irabiatu da. Bitartean, saiakuntzan erabiliko diren bainua eta Ubbelholde kapilarra 25 °C-tan mantendu dira. Liskatasun neurketa, disoluzioa kapilarreko bi marken artean igarotzeko behar den denbora tartea kuantifikatzean datza. Lagin bakoitzarekin bost saiakuntza egin dira, t_1 eta t_2 baloreak lortuz, non t_1 eta t_2 , 1 eta 2 disoluzioek bi marka tartea igarotzeko behar duten denbora

diren hurrenez hurren. Datu hauekin, liskatasun erlatiboa (η_{erl}), ondorengo ekuazioaren bitartez lortu da:

$$\eta_{erl} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t_2}{t_1} \quad \text{[II.1]}$$

ASTM D1795-96 araua jarraituz, lortutako liskatasun erlatiboko baloreekin eta laginaren kontzentrazioarekin (c), $[\eta]$. c balorea lortzeko abakoa jarraitu da liskatasun intrintsekoaren balorea $[\eta]$ kalkulatzeko (ASTM, 1996). Lorturiko liskatasun balioak $[\eta]$, laginen polimerizazio mailarekin erlazionaturik daude ondoko Mark-Houwink-en ekuazio enpirikoaren arabera (Marx-Figini, 1987):

$$[\eta] = k \times PM^\alpha \quad \text{[II.2]}$$

non $[\eta]$, liskatasun intrintsekoa, PM , polimerizazio-maila eta, k eta α , polimerodisolbatzaile sistemarekin erlazionaturiko konstanteak diren. Konstante hauek, PM -ren funtziopean daude: $PM < 950$ denean, $0,42 PM$ adierazpena erabiltzen da eta, $PM > 950$ denean aldiz, $2,28 PM^{0,76}$ adierazpena (Marx-Figini, 1987; Henriksson eta al., 2008)

II.2.5. Gel-iragazkorreko kromatografia

Sintetizaturiko poliuretanoaren masa molekularra eta masa molekularren banaketa, gel-iragazkorreko kromatografiaren (GPC) bidez kalkulatu da. Thermo Scientific etxeko kromatografo bat erabili da, zeinek Dionex UltiMate 3000 bonba isokratikoa eta RefractoMax 521 errefrakzio indize detektagailua dituen. Banaketa, UltiMate 3000 termostatizatutako zutabe konpartimentu batean aurkitzen diren $5 \mu\text{m}$ -ko partikula tamaina eta 10^5 , 10^3 , 100 eta 50 \AA -ko poro tamaina duten lau Phenogel (Phenomenex) zutabeekin $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -tan egiten da. Laginak tetrahidrofuranotan (THF) (masan %1-ean) disolbatu dira. Fase garraiatzaile bezala THF-a erabili da, $1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ -ko fluxu abiadurarekin. Masa molekularra eta sakabanatze maila, poliestireno monosakabanatu patroiekiko erreferituta kalkulatu da.

II.2.6. Indukzio bidez akoplatutako plasma iturridun masa-espektrometroa

Montmorillonita eta bakterio-zelulosan oinarrituriko bionanokonpositeen montmorillonita edukia, ^{28}Si elementua edo atomoaren edukia determinatuz kalkulatu da. Lehenik laginen digestioa burutu da. Horretarako, 50 mg lagin, azido nahaste (5 mL azido nitrikoa, 2 mL azido fluorhidrikoa eta 15 mL azido borikoa) batean murgildu dira eta ondoren, mikrouhin sistema batean $200 \text{ }^\circ\text{C}$ -tan potentzia maximoa (%90) aplikatuz

berotu dira. Laginak, indukzio bidez akoplatutako plasma iturridun masa-espektrometroari akoplaturiko ablazio sistema laserduna (*LA-ICP-MS*) (Agilent Technologies 7500ce) erabiliz analizatu dira. Interferentziak ekiditeko langargailu bat eta PFA aerosol ganbera bat, 2,5 mm-ko barne diametroa, erabili dira. Laginak kuantifikatzeko erabilitako softwarea *ICP-MS ChemStation G1834B* sistema izan da.

II.2.7. Porotasuna

Zelulosa eta indarturiko zelulosa mintzen porotasunaren (P) determinazioan, 100 °C-tan eta 24 orduz lehorturiko laginak erabili dira. Porotasuna, mintzen dentsitate teorikoa (ρ_t) eta mintzen dentsitatearen (ρ_m) arteko erlazioaren bitartez aztertu da, Mwaikambo eta Ansell-ek proposatu zuten ekuazioa erabiliz (Mwaikambo eta Ansell, 2001):

$$P = \left(1 - \frac{\rho_m}{\rho_t}\right) \times 100 \quad [\text{II.3}]$$

Bakterio-zelulosa mintzetan, zelulosaren dentsitate teorikoa $\rho_{\text{zelulosa}} = 1,592 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$ da. Bionanokonpositeen dentsitatea, lagina osatzen duten bi osagaien dentsitate teorikoak eta bakoitzaren frakzioak kontutan izanik kalkulatu daiteke.

Aldiz, mintzen dentsitatea ρ_m , Arkimides-en balantzaren bitartez kalkulatu da, disolbatzaile bezala bentzenoa erabiliz ($\rho_{\text{bentzenoa}} = 0,870 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$) eta lagin lehorraren masa (m_0) eta balantzak emandako bultzada (B) balioaren arabera kalkulatu delarik:

$$\rho_m = \frac{m_0}{B} \times \rho_{\text{bentzenoa}} \quad [\text{II.4}]$$

II.2.8. Fourier-en transformatuaren espektroskopia infragorria

Fourier transformatuaren espektroskopia infragorria (*FTIR*), BZ puruen eta BZ bionanokonposite ezberdinen egitura kimikoaren analisisan erabili da, Nicolet Nexus espektrometroa erabiliz, erreflektantzia orokor moteldu (*ATR*) Golden Gate (Specac) osagarriarekin. Espektrou guztiak 128 ekorketa burutuz lortu dira 4000-750 cm^{-1} uhin zenbaki tartean eta erabilitako bereizmena 4 cm^{-1} -takoa izan da. Horrez gain, *FTIR-ATR*-a BZ-ren kristaltasun indizea (KI^{FTIR}) kalkulatzeko erabili da, 1427 cm^{-1} eta 897 cm^{-1} banden azalaren arteko erlazioaren bitartez (Kataoka eta Kondo, 1998; Ouajai eta Shanks, 2005).

II.2.9. Erresonantzia magnetiko nuklearra

Karbonozko erresonantzia magnetiko nuklearra (^{13}C NMR), ingurune eta baldintza ezberdinetan biosintezaturiko zelulosen egitura kimikoaren analisisian erabili da. Laginen egitura kimikoa aztertzeko, egoera solidoan burututako polarizazio gurutzaturiko eta angelu-magikoaren errotazioaren bidezko (CP-MAS) ^{13}C NMR espeketroak Bruker 400 WB gailuan 100,6 MHz-ko erresonantzia maiztasuna eta 4 mm-ko zundak erabiliz lortu dira.

II.2.10. X-izpien difrakzioa

X-izpien difrakzioa (XRD), zelulosa ezberdinen eta bionanokonpositeen kristaltasuna aztertzeko erabili da. Horretaz gain, buztin nanokargekin eraldatutako bionanokonpositeetan buztinaren dispersio maila aztertzeko ere erabili da. XRD difraktogramak PANalytical Xpert PRO difraktometro automatikoa erabiliz lortu dira, 40 kV eta 40 mA-tan lan eginez, θ - θ konfigurazioko Bragg-Brentano geometriarekin, bigarren mailako monokromatzaile bat eta $\text{CuK}\alpha$ ($k = 1,54 \text{ \AA}$)-tako erradiazioarekin $2\theta = 10$ - 40° bitartean. X-izpien difraktometriaren bitartez, laginen kristaltasun indizeak aztertu dira. Kristaltasun indizea (KI^{XRD}), Segal eta al.-ek proposaturiko metodo enpirikoaz kalkulatu da (Segal et al., 1959):

$$KI^{XRD} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \quad [\text{II.5}]$$

non I_{200} , zelulosaren (200) plano kristalografikoari dagokion pikoaren intentsitatea den ($2\theta \approx 22,7^\circ$) eta I_{am} , laginaren zati amorfoak sakabanatutako intentsitatea den ($2\theta \approx 18^\circ$).

Honez gain, Bragg-en ekuazioaren bidez planoen arteko distantzia ere kalkulatu daiteke (Bragg eta Bragg, 1913):

$$n \times \lambda = 2 \times d \times \sin\theta \quad [\text{II.6}]$$

zeinetan n , difrakzio-maila, λ , X-izpien uhin luzera, d , kristal planoen arteko distantzia eta θ , difrakzio-angelua diren.

II.2.11. Izpi ultramore-ikuskorreko espektrofotometroa

Lagin ezberdinen opakotasuna (OP) aztertzeko, Shimadzu etxeko (UV-3600) izpi ultramore-ikuskorreko (UV-ikus) espektrofotometroa erabili da. Laginak laukizuzen

forman trokelatu eta zuzenean espektrofotometroaren test zelula batean jartzen dira eta erreferentzia gisa test zelula huts bat erabiliz, 200-800 nm uhin luzera bitartean espeketroak lortu dira. Lagin ezberdinen OP kalkuluetan [II.7] ekuazioa erabili da (Tunç eta Duman, 2010; Giménez et al., 2009):

$$OP = \frac{Abs_{600}}{I} \quad [II.7]$$

non Abs_{600} , 600 nm-tan lortutako absorbantzia eta I , laginen lodierak diren. Eraitza esanguratsuak izan daitezten, sistema bakoitzaren hiru saiakuntza burutu dira lagin bakoitzerako.

II.2.12. Ur-xurgapena

BZ-aren izaera hidrofilikoa dela eta, ura xurgatzeko ahalmen handia du. Ur-xurgapen ratioa (UXR) aztertzeko, labean 100 °C-tan eta 24 orduz lehorturiko film ezberdinak, ur desionizatuan murgildu dira giro tenperaturan eta ondoren, denboran zehar xurgaturiko ur edukia neurtu da. Horretarako, sistema ezberdinen lagin bakoitzaren UXR balioa hurrengo formularen bitartez kalkulatu dira:

$$UXR = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad [II.8]$$

non m_0 , lagin lehorraren masa den eta m_t , aldiz, uretan murgildu ondoren denbora ezberdinetan lorturiko masari dagokio.

II.2.13. Ur-atxikipen gaitasuna

BZ-an oinarritutako bionanokonpositeen aplikazioetarako ur-atxikipen gaitasuna (UAG) ezagutzea garrantzitsua da eta horregatik, UAG saiakuntza burutu da. Hasteko, aurretik hutsunean lehortutako mintz eta film lehorraren masa (m_i) determinatzen da eta ondoren, lagina ur desionizatuan murgiltzen da masa konstante batera iritsi arte, masa hezea (m_h). Prozedura sistema bakoitzeko hiru laginekin errepikatu da. UAG -a ondorengo ekuazioaren bidez kalkulatu daiteke:

$$UAG(\%) = \left(\frac{m_h - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad [II.9]$$

II.2.14. Kontaktu-angelua

Kontaktu-angelua (KA) (θ_c), likido baten eta gainazal baten arteko afinitatearen menpekoa da. Lan honetan, kontaktu-angelua determinatzeko, Data Physics etxeko, Contact Angle System OCA ekipoa erabili da. Lagina plataforma horizontal mugikor baten gainean jartzen da eta mikro-orratz baten laguntzaz $3 \mu\text{L}$ -ko ur destilatu tanta bat ezartzen da filmaren gainazalean. Bideokameraz lorturiko irudien bidez, laginaren eta tantaren arteko kontaktu angelua aztertu da.

II.3. KARAKTERIZAZIO TERMIKOA

II.3.1. Analisi termogravimetricoa

Analisi termogravimetricoa (TGA), laginen hegazkortasunari atxikitako masa aldaketan neurketa kuantitatiboan oinarritzen da. Teknika honen bitartez lortutako laginen egonkortasun termikoaren azterketa burutu da. Horretarako, Mettler Toledo etxeko TGA/SDTA 851 ekipoa erabili da. Saiakuntzak 2-4 mg bitarteko laginak erabiliz, giro tenperaturatik $800 \text{ }^\circ\text{C}$ -tara $10 \text{ }^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$ -ko abiaduraz, bai oxigeno bai nitrogeno inguruetan, burutu dira. Laginen masa galera tenperaturaren aurrean analizatu dira. Laginaren masa vs. tenperatura makurretik hezetasuna, hasierako depolimerizazioa edo degradazio tenperatura (T_0), degradazio maximoaren tenperatura (T_{max}) eta 700 edo 800 $^\circ\text{C}$ -tako erraunts-edukia (%) determinatu dira.

II.3.3. Ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala

Mettler Toledo etxeko DSC822^e kalorimetroarekin ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala (DSC) burutu da, *Intracooler* hozte sistema erabiliz giro tenperatura baino baxuagoko datuak lortzeko. Tenperatura eta bero-fluxua indio patroia erabiliz kalibratu dira. Saiaketan zehar gerta daitezkeen lagin galerak saihesteko, 5-10 mg bitarteko lagin kopurua aluminio kapsuletan ezarri da eta kapsula hauek aluminiozko estalki batekin itxi dira. Laginen portaera termikoa aztertzeko ekorketa dinamikoak burutu dira $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -tik $250 \text{ }^\circ\text{C}$ -raino, $10 \text{ }^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$ -ko abiadura erabiliz, etengabeko nitrogeno fluxupean.

II.4. KARAKTERIZAZIO MEKANIKOA ETA MEKANIKO-DINAMIKOA

II.4.1. Trakzio saiakuntza

Propietate mekanikoen determinaziorako, trakzio saiakuntzak burutu dira MTS Insight 10 gailu elektronikoa erabiliz. Trakzio saiakuntzak 250 N-eko karga zelularekin eta $1 \text{ mm} \times \text{min}^{-1}$ -ko abiaduran burutu dira, euskarrien arteko distantzia 22 mm-tan finkatu delarik

ASTM D1708-93 arauaren arabera (ASTM, 1993). Saiakuntzan erabilitako laginen neurria, $30 \times 5 \times l$ mm³-koa da, non l , laginaren lodiera den. Tentsio-deformazio makurretik Elastikotasun modulua (E), tentsio-erresistentzia (σ) eta hausturako deformazioa (ϵ) determinatu dira.

II.4.2. Analisi mekaniko-dinamikoa

Materialen joera biskoelastikoa aztertzeko, anplitude txikiko neurketa oszilakorrak erabiltzen dira sarritan. Modu honetan, maiztasun edo frekuentzia jakin batekin aplikatzen den deformazioa, sinusoidalki aldatzen da denbora eta tenperaturarekin. Azterketa biskoelastikoa burutzeko, analisi mekaniko-dinamikoa (*DMA*) egin da. Saiakuntzarako $25 \times 5 \times l$ mm³-ko dimentsioa duten laginak trokelatu dira, non l laginaren lodiera den eta hauen analisia, Gabo etxeko Eplexor 100 N analizatzailean burutu da %0,05-eko hasierako deformazioa eta trakzio geometria erabiliz. Entseiu guztiak, 1 Hz-ko maiztasuna eta 2 °C x min⁻¹-ko berotze abiadura erabiliz, -100 °C-tik 250 °C-ra tenperatura tarte erabiliz egin dira. Pilaketa moduluaren eta galera-faktorearen ($Tan\delta$) bilakaera tenperaturaren aurrean aztertu dira.

II.5. KARAKTERIZAZIO MORFOLOGIKOA

II.5.1. Mikroskopia optikoa

Mikroskopia optikoa (*OM*), almidoiaren gelatinizazio prozesuaren jarraipena burutzeko erabili da. Horretarako, Nikon Eclipse E600 mikroskopia, kaltzitazko prisma polarizatuarekin hornituta erabili da.

II.5.2. Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa

Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoaren (*SEM*) bitartez, biosintetizaturiko zelulosaren eta prestatuturiko bionanokonposite ezberdinen gainazal eta zeharkako sekzioaren azterketa morfologikoa burutu da. Gainazalean ez bezala, zeharkako sekzioa aztertzeko, nitrogeno likidoarekin laginen haustura burutu da. *SEM* behaketa egiteko, laginak urre/paladioarekin estaltzen dira eta ondoren, JEOL JSM 6400 modeloko mikroskopia elektronikoaren bidez behatuz 20 kV-tara jarduten da.

II.6. IRAGAZKORTASUNA

Iragazkortasuna, material batek bere barnetik jariakin bati (likidoa edo gasa) pasatzen uzteko propietateari deritza. Lan honetan, ur-lurrun zein oxigenoarekiko iragazkortasuna aztertu da.

II.6.1. Ur-lurrunarekiko iragazkortasuna

Zelula grabimetrikoek lurrun eta likidoen iragazkortasun balioak neurtzea ahalbidetzen dute eta ondorioz, zuzenean iragazkortasun-koefizientea. Ur-lurrunarekiko iragazkortasun saiakuntzak, Sartorius BP210D zelula grabimetrikozko balantza (10^{-5} g bereizmena) batean burutu dira termikoki egokituriko kanpai batean, 25 °C-tan eta ASTM E96-95 araua jarraituz burutu da (ASTM, 1995). Zelula urez betetzen da (ur puruaren ur-aktibitatea, 1 izanik) eta zelularen irteera bionanokonposite filmarekin estaltzen da, honela ur-lurruna ateratzeko filma zeharkatu behar du. Saiakuntzan zehar, filmeen alde bietan sortzen den kontzentrazio ezberdintasunak medio, zelulan ur-lurrunarekin erlazionaturik dagoen masa transferentzia pairatzen da. II.10 ekuazioaz ur-lurrunarekiko iragazkortasun (*ULI*) balioa kalkulatu da:

$$ULI = \frac{ULTT}{P_v} \quad [II.10]$$

$$ULTT = \frac{m \times l}{A \times (a_b - a_k)} \quad [II.11]$$

non *ULTT*, ur-lurrun transmisio tasa, *m*, laginen masa den, *l*, filmen lodiera, *A*, ur-lurrunarekin esposizioan dagoen film azalera ($2,54 \text{ cm}^2$), *a_b* eta *a_k*, hezetasun-erlatiboak zelularen barrualdean (*b*) eta kanpoaldean (*k*) eta *P_v*, giro tenperaturaren lurrun-presioa den. Sistema guztientzako hiru lagin entseiatu dira eta batz bestekoa atera da.

II.6.2. Oxigenoarekiko iragazkortasuna

Oxigenoarekiko iragazkortasun (*OI*) balioak determinatzeko, MOCON OX-TRAN 2/21 etxeko neurgailua erabili da eta entseiuak ASTM D3985-10 araua jarraituz burutu dira (ASTM, 2010). Lan honetan, zelulosa hutsaren eta bionanokonposite ezberdinen oxigenoarekiko iragazkortasun saiakuntzak $5 \times 50 \text{ mm}^2$ -ko lagin azaleran, 760 mm Hg-ko presioan, %50 hezetasun-erlatiboan eta 23 °C-tan egin dira. Sistema bakoitzeko hiru laginen emaitzen batz bestekoa atera da.

II.7. IN VITRO ERANTZUN ZELULARRA

II.7.1. Zitotoxikotasuna

In vitro saiakuntza zelularra, medikuntza arloan erabiltzeko biomaterialen ebaluaketako lehen etapa da. Zitotoxikotasun saiakera, biomaterialen biokonpatibilitateari buruzko informazioa lortzeko aurreentsaiu bat da. Entseiuak L-929

murino fibroblasto zelulak erabiliz burutu dira, ISO 10993-11:2009 araudia (ISO, 2009) jarraituz. Laginak Mili-Q urarekin garbitu dira eta %100 etileno oxido lurruna erabiliz esterilizatu dira eta 7 egunetan gasgabetzen utzi dira. Ondoren, esterilizaturiko laginak hazkuntza zelularreko ingurune estandar batean murgildu dira, Dulbecco-en Eagle hazkuntza ingurune eraldatuan hain zuzen ere (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), eta aldi berean %10-ko esneki-txahal gazurra (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) eta antibiotiko-antimikotiko soluzio batekin osatua (Sigma- Aldrich), 24 orduz eta 37 °C-tan mantendu da, erauzitako hartzidura-ingurunea lortzeko. Honez gain, saiakera baino 24 ordu lehenago, 96 kikarako mikroplaketan L-929 murino fibroblasto zelulak erein dira eta hazten utzi zaie 4×10^3 zelula/kikara dentsitatean, hazkuntza ingurune estandarra erabiliz. Zitotoxikotasun saiaketetan, ingurune hauek erauzitako hazkuntza-ingurunearekin tratatu dira 24 eta 48 orduz. Kontrol moduan, hazkuntza ingurune estandarrak erabili dira, dentsitate altuko polietilenoa (HPDE, kontrol negatiboa, USP Rockville, USA) eta polibinil kloruroa (PVC, kontrol positiboa, Portex, UK).

Zelulen bideragarritasuna eta hazkuntza aztertzeko, MTT kolorimetria saiaketa erabili da, zelula bideragarrien aktibitate metabolikoa aztertuz (Cell Proliferation Kit I MTT, Roche). Saiaketa hau, zelula bizidunen mitokondrietan ematen den 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuroaren erredukzio prozesuan oinarritua dago, formazana emanez. Kikarako zelula kopurua formazan kristal edukiarekiko proportzionala da, eta mikroplaka irakurgailu bat (ELISA) erabiliz neurtu da, absorbantzia neurketak 540 nm-tan burutuz. Bideragarritasuna portzentaia [II.12] ekuazioaren bidez kalkulatu da:

$$Bideragarritasuna(\%) = \frac{[A]_{test}}{[A]_{kontrol}} \times 100 \quad [II.12]$$

non $[A]_{test}$, lagin-zelulen eta $[A]_{kontrol}$, kontrol negatiboko zelulen absorbantziak diren. Lagin guztientzat hiruna saiakera burutu dira, batez besteko balioak eta desbideratze estandarrak lortuz.

II.7.2. Zelulen itsaspena

L-929 murino fibroblasto zelulek zelulosaren gainazalean duten itsaspen eta bideragarritasuna aztertzeko, *Live/Dead* saiakuntza egin da. Horretarako, esterilizaturiko 0,5 cm²-ko disko formako laginak, 24 kikaradun hazkuntza platerretan (Sarstedt, Alemania) jarri dira eta 5×10^4 zelula x mL⁻¹-ko dentsitatea duten fibroblasto zelulen alikuotak, 15 µL-ko tantekin ordubetez, laginen gainazalean erein dira. Zelulak itsastean,

1 mL ingurune gehitu da eta aldizka aldatzen da. Zazpi egun igaro ondoren, fibroblastoak 3,9 μM AM-kaltzeina (Sigma-Aldrich,) eta 5,9 μM propidio ioduroa (Life Technologies, Carlsbad, AEB) inguruneetan inkubatu ziren. Laginak orduan mikroskopio optiko konfokalaren (Olympus LV500) bidez aztertu ziren.

II.8. BIODEGRADAGARRITASUNA

Gaur egun, biodegradagarritasuna neurtzen duten metodo gehienak, oxigeno arnasketa neurgailuan oinarritzen dira, non arnasketa biologikoan kontsumitutako oxigeno tasaren neurketa zuzena burutzen den. Hala ere, badira beste metodo batzuk, polimeroen beste propietate batzuk jasaten duten aldaketaren arabera, biodegradarritasuna baloratzeko erabiltzen direnak, besteak beste, masa galeran oinarritzen direnak. Lan honetan, masa eta galeraren metodologiak zailtasun handiak ekarri ditu, laginetan itsatsita gelditutako lur zatiek, masaren eta galeraren balore zehatza lortzea saihesten baitute. Hala ere, zelulosan oinarritutako hainbat materialen ontziratze erabilera kontutan izanik, biodegradagarritasun saiakera kualitatiboa burutu da. Bizkaian, Gorbeia mendi inguruan dagoen lurraren biodegradagarritasun ekintzaren ideia bat lortu nahi izan da. Horretarako, 40 cm-ko diametroa eta 7 cm-ko sakontasuneko ontzi bat lurrez bete da eta bertan, 1 cm^2 -ko dimentsioko laginak lurperatu dira 3 cm-tako sakoneran. Laginak, 25 $^{\circ}\text{C}$ -tan estaliak biltegitratu dira hezetasuna ahal den neurrian mantenduz, noizbehinka urarekin lurra umelduz. Gainera, sistema bakoitzeko bi lagin lurrean lurperatu dira eta denbora ezberdinetan lagina lurretik atera eta aurkezten duen degradazio maila, irudi ezberdinen bitartez aztertuko dira, laginak guztiz desagertu arte.

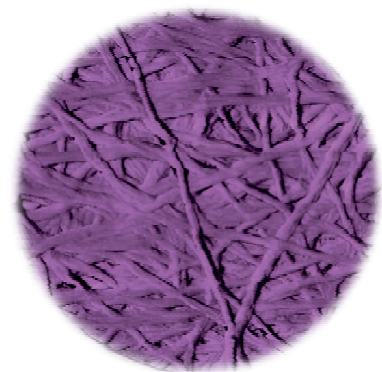
II.9. BIBLIOGRAFIA

- ASTM, 1993, D1708-93 (1993). *Test method for tensile properties of plastics by use of microtensile specimens*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM, 1995, E96-95 (1995). *Standard test methods for water vapour transmission of materials*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM, 1996, D1795-96 (1996). *Test method for intrinsic viscosity of cellulose*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM, 2010, D3985-10 (2010). *Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastics film and sheeting using a Coulometric Sensor*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Bragg, W. H., Bragg, W. L. (1913). *The reflexion of X-rays by crystals*. Proceeding of the Royal Society of London A, 88, 428-438.
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I. (2012). *Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of Gluconacetobacter genus*. Carbohydrate Polymers, 89, 1033-1037.

- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., Montero, M. P. (2009). *Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin*. Food Hydrocolloids, 23, 585-592.
- Henriksson, M., Berglund, L. A., Isaksson, P., Lindström, T., Nishino, T. (2008). *Cellulose nanopaper structures of high toughness*. Biomacromolecules, 9, 1579-1585.
- Hestrin, S., Schramm, M. (1954). *Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. Biochemistry Journal, 58, 345-352.
- ISO, 2009, 10993-11:2009 (2009). *Biological evaluation of medical devices, Part 11: Tests for systemic toxicity*.
- Kataoka, Y., Kondo, T. (1998). *FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation*. Macromolecules, 31, 760-764.
- Marx-Figini, M. (1987). *Evaluation of the accessibility of celluloses by intrinsic viscosity ratio*. Polymer Bulletin, 17, 225-229.
- Mwaikambo, L., Ansell, M. (2001). *The determination of porosity and cellulose content of plant fibres by density method*. Journal of Materials Science Letters, 20, 2095-2096.
- Oujai, S., Shanks, R. A. (2005). *Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments*. Polymer Degradation and Stability, 89, 327-335.
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. J., Conrad, C. M. (1959). *An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer*. Textile Research Journal, 29, 786-794.
- Tunç, S., Duman, O. (2010). *Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films*. Applied Clay Science, 48, 414-424.

III. Atala

BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA



III. BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA

III.1. HELBURUA

Atal honen helburu nagusiak, ezaugarri ezberdineko bakterio-zelulosaren biosintesia eta karakterizazioa dira, *Gluconacetobacter medellinensis* anduia inokulu bezala erabiliz. Zelulosaren biosintesarako, mikroorganismoentzat bi hartzidura-ingurune ezberdin erabili dira. Alde batetik, pinaburu hondakin solidoetan oinarrituriko ez-ohiko ingurunea eta bestetik, erreferentzi gisa erabili ohi den Hestrin eta Scharmm hartzidura-ingurune estandarra. Horretaz gain, biosintesi baldintza ezberdinak erabili dira, hots estatikoa eta dinamikoa.

Lehenik eta behin, bi ingurune horien karakterizazioa burutu da; hala nola, azukre konposizioa eta oinarritzko analisia eginez. Ondoren, ingurune eta baldintza ezberdinetan zelulosaren biosintesarako mikroorganismoak kontsumituriko oxigenoa determinatu da, konposizio eta hartzidura-baldintzekin erlazionaturik baitago. Era berean, inkubazio denbora iragan ondoren, lorturiko bakterio-zelulosaren etekina determinatu da. Azkenik, zelulosa laginen azterketa fisiko-kimikoa eta morfologikoa burutzeaz gain, medikuntzan izan ditzazkeen aplikazioak ikusirik, ez-ohiko ingurune eta baldintza estatikoko zelulosaren *in vitro* erantzun zelularra aztertu da.

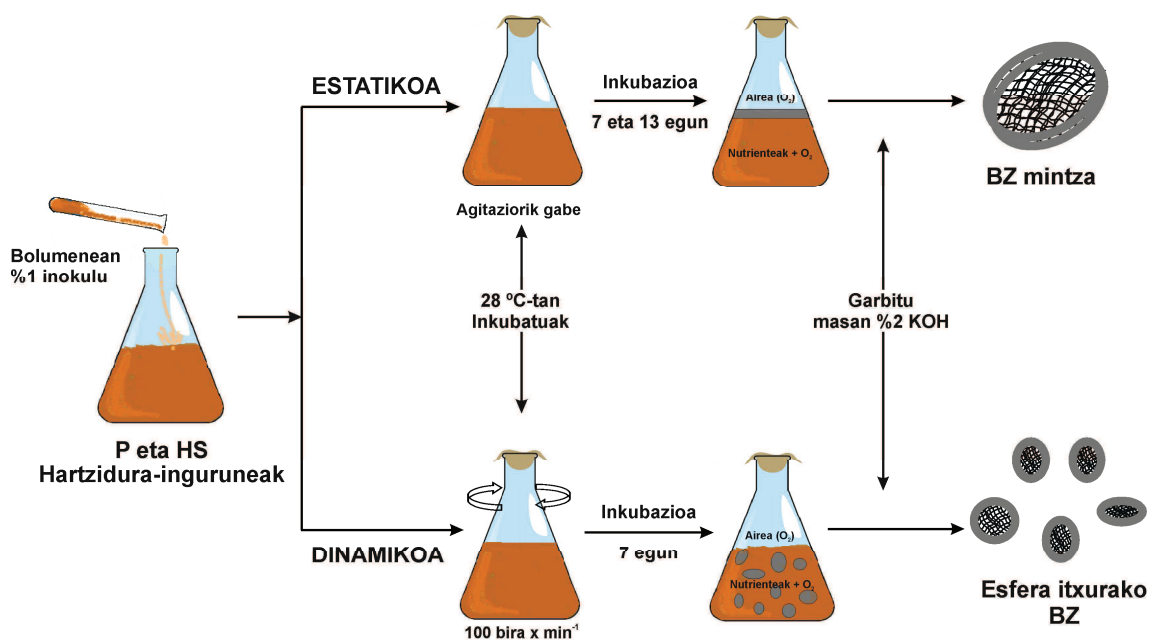
III.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA

Bakterio-zelulosa (BZ) *Gluconacetobacter medellinensis* bakterio-anduiarekin ingurune ezberdinak erabiliz sintetizatu da, alde batetik pinaburu hondakin solidoetatik eratorritako ez-ohiko ingurunea (P) eta bestetik, Hestrin eta Scharmm (HS) ingurune estandarra (Hestrin eta Scharmm, 1954).

P ingurunea prestatzeko, azukre kanabera eta pinaburu zukuak nahastu dira. Horretarako, 40 g pinaburu azala garbitu, birrindu eta iragazten dira 1 L ur erabiliaz. Ondoren, pinaburu azaleko hondakinetatik eratorritako zukua prestatzen da. Aldi berean, 93,43 g azukre kanabera 1 L ur desionizatuan disolbatzen dira. Prestatutako ingurune honen azukre konposizioa eraginkortasun handiko kromatografo likidoa erabiliz aztertu da, konposizioa g x L⁻¹-tan 82,6 sukrosa, 4,8 glukosa, 5,04 fruktosa, <0,49 maltosa eta <0,39 maltotriosa izanik. HS ingurunea 20,0 g glukosa, 5,0 g peptona, 5,0 g legamia, 7,0 g Na₂HPO₄, eta 1,1 g azido zitriko 1 L uretan disolbatuz prestatu da. BZ-ren biosintesian erabili aurretik bi inguruneak 15 minutuz 120 °C-tan autoklabean esterilizatu dira.

Bai P ingurunean eta bai HS ingurunean, baldintza estatikoan (S) eta dinamikoan (D) lan egin da. Lehenik hasierako inokulu disoluzioa 3,5-ko pH-an P eta HS inguruneetan inkubatzen da, disoluzioaren pH-a azido azetikoarekin doituz. Baldintza dinamikoan, 250 mL ingurune inkubatzen dira bolumenean %1 inokulu erabiliz. Hartzidura prozesua, bai P eta HS inguruneetan 28 °C-tan 100 bira x min⁻¹-ko abiadurarekin (agitazio orbitala erabiliz) 7 egunetan ematen da, esfera itxurako BZ lortuz, BZ-P/D eta BZ-HS/D deiturikoak. Baldintza estatikoan berriz, BZ mintza 28 °C-tan 7 eta 13 egunen zehar 2 L-tan bolumenean %1-an inokulua ingurunean inkubatuz lortzen da. Zazpi eguneko biosintesiak burutu dira baldintza dinamikoan lorturiko laginen etekinarekin konparatu ahal izateko. 13 egun ondoren lorturiko BZ laginak BZ-P/S eta BZ-HS/S gisa izendatu dira. Azkenik, hartzidura-ingurunetik lorturiko mintz edota esfera itxurako BZ laginei purifikazio tratamendua burutu zaie. Horretarako, BZ lagin guztiak urarekin garbitu ondoren, masan %2 potasio hidroxido (KOH) disoluzioarekin, 1 g zelulosa hezea eta 20 mL disoluzio erlazioan, 24 orduz giro temperaturan tratatu dira, gainazalean geratutako hondakinak eta osagai ez-zelulosikoak kentzeko.

Azkenik, laginak uretan murgilduz eta behin eta berriz ura aldatuz garbitu dira neutralizazioa lortu arte. Purifikazio tratamenduaren osteko laginak liofilizazioz lehortu dira, beraien egitura bere horretan mantentzeko helburuarekin. Baldintza dinamikoan zein estatikoan jarraituriko biosintesiaren eskema, **III.1.Irudia** aurkezten da.



III.1. Irudia. Hartzidura-ingurune eta baldintza ezberdinetan, BZ-ren biosintesisirako jarraituriko protokoloaren eskema.

III.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

III.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa

Etekina

P eta HS inguruneetatik lorturiko BZ laginen etekina, bai baldintza estatikoan zein dinamikoan, **III.1. Taulan** azaltzen da.

III.1. Taula. Ingurune eta hartidura-baldintza ezberdinetan lortutako BZ laginen etekina, CHN edukiak eta azukre konposizioa.

Sistema	Etekina (g x L ⁻¹)		CHN edukiak (%)			Azukre konposizioa	
	7 egun	13 egun	C	H	N	Mota	(g x L ⁻¹)
BZ-P/S	3,24 ± 0,42	3,97 ± 0,36	41,20	6,30	0,43	Sukrosa	82,60
BZ-P/D	0,82 ± 0,26	-				Glukosa	4,80
						Fruktosa	5,04
						Maltosa	< 0,49
						Maltotriosa	< 0,39
BZ-HS/S	1,94 ± 0,10	2,15 ± 0,52	35,60	6,80	0,68	Glukosa	20,0
BZ-HS/D	0,44 ± 0,01	-					

Ikus daitekeenez, P ingurunean lortzen den etekina (g x L⁻¹-tan adierazita) HS ingurunean lortutakoa baino handiagoa da, edozein baldintzetan. Argitu beharra dago, ezin izan direla BZ esfera-itxurako laginak lortu 7 egunetik aurrera, esferak aglomeratzen baitziren, aldiz baldintza estatikoan 7. egunetik 13. eguna bitartean, taulan ikus daitekeen moduan, etekina handitu egin da, %23-an hain zuzen, hori dela eta bibliografian baldintza estatikorako 8 egunetik 13 eguneko denbora finkatzen da optimo gisa (Castro et al., 2012). Honekin batera, ingurune ezberdinen karbono (C), hidrogeno (H) eta nitrogeno (N) edukiak oinarriko analisiaren (CHN) bitartez aztertu dira. Ez-ohiko inguruneak, %41,20 C, %6,30 H, eta %0,43 N konposizioa aurkezten du eta hartidura-ingurune estandarrean berriz, %35,60, 6,80 eta 0,68 dira C, H eta N edukiak, hurrenez hurren. Hortaz, P ingurunean etekin handiagoa izatearen arrazoietakoa bat, azukre ezberdinek aurkezten duten karbono (C) eduki handiangoan datza (Embuscado et al., 1994; Dahman et al., 2010).

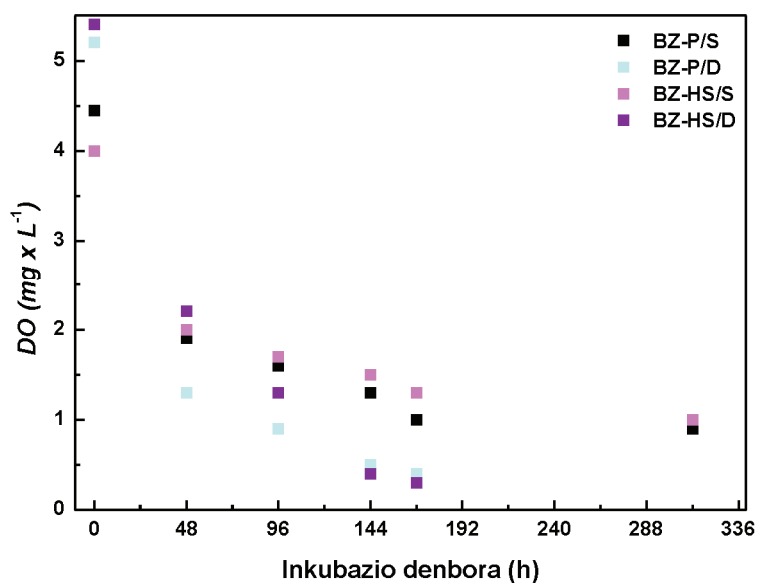
Bestalde, bi hartzidura inguruneetan erabilitako azukre konposizioa eta kontzentrazioa desberdina dela ikus daiteke. Bi hartzidura inguruneetan errepikatzen den azukre bakarria glukosa da, P ingurunean $4,80 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ kontzentrazioarekin eta 4 aldiz handiagoa HS ingurunean. Hala ere, P ingurunean lorturiko etekinak handiagoak dira. Hainbat lanetan aipatu izan da, glukosa karbono iturri gisa erabiltzean, BZ-ren produkzioan azido glukonikoa sortzen dela, honek ingurunearen pH-a murriztuz eta ondorioz, etekin baxuagoak lortuz. Hainbat lanetan ikusi den moduan, ez-ohiko inguruneetan, baliteke fruituetatik eratorritako antioxidatzaile eta polifenol konposatuek azido glukonikoaren sorrera inhibitzea, zelulosaren hazkuntzan laguntzen dutelarik (Soong eta Barlow, 2004; Keshk eta Sameshima, 2006; Chawla et al., 2009). Honela, BZ biosintesia aztertu izan den hainbat lanetan, laborantza eta industri hondakinetatik eratorritako inguruneak erabiltzean, BZ etekin altuagoak lortu izan dira ingurune estandarrekin (HS) lorturikoak baino eta hau karbono iturri gisa azukre bakarria erabili beharrean fruitu zukuetan (laranja, koko, *Aloe Vera*, oliba-urina, etab.) aurki daitezkeen azukre anizkoitzek, etekinean duen efektu positiboarekin erlazioa daiteke (Embuscado et al., 1994; Kongruang, 2008; Kurosumi et al., 2009; Saibuatong eta Phisalaphong, 2010; Gomes et al., 2013). Beraz, ez-ohiko ingurunean bakteriozelulosaren etekin handiagoa dela eta BZ-ren biosintesisirako karbono iturri potentzial gisa kontsidera daiteke.

I. atalean aipatu den bezala, hartzidura aerobikoan, oxigenoaren presentzia ezinbestekoa da mikroorganismoaren arnaste prozesua gertatzeko. Gainera, kasu honetan *Gluconacetobacter medellinensis* bakterio-anduia aerobikoa da, hots, hazteko oxigenoa behar du. Horregatik, zelulosaren biosintesisirako ingurunean disolbaturik dagoen oxigenoa (DO) garrantzizko faktorea bilakatzen da. Lan honetan, ingurune bakoitzeko DO balorazio bidez determinatu da, aurreko atalean (II.2.2. sekzioan) aurkeztutako *Winkler* metodoaren bitartez. **III.2. Irudian**, ingurune eta baldintza ezberdinetan eta hartzidura prozesuko inkubazio denbora ezberdinetan (48, 96, 144, 168 eta 312 h-tara), inguruneko DO kantitatea aurkezten da $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ eta %-tan adierazita.

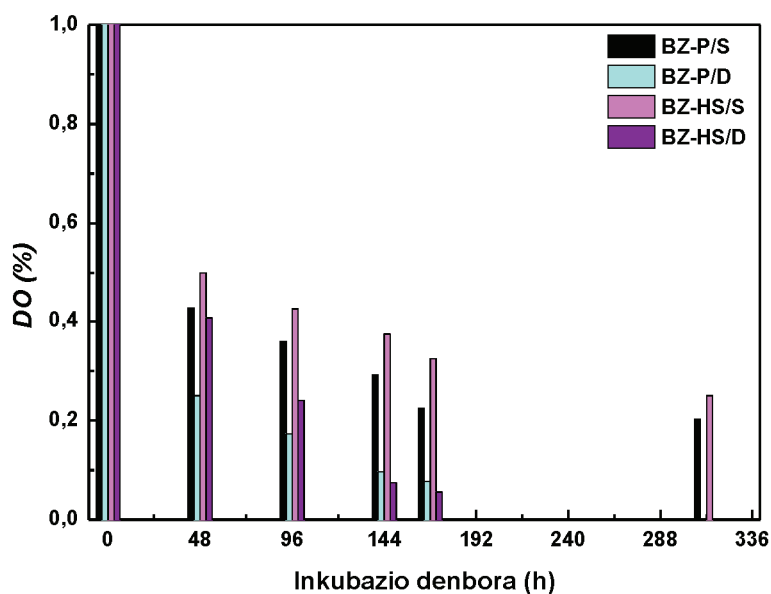
III.2a. Irudian ikus daitezkeen bezala, baldintza ezberdinetan burututako hartzidura prozesuetan, oxigenoa kontsumitzen doa, DO kontzentrazioa jaitsiz. Bertan, hasieran beharokada nabarmen bat ikus daiteke %50-era edo gehiagora iristen delarik. Etapa honetan, mikroorganismoek beraien metabolismoa ingurunera moldatzen dute eta oxigeno kantitate handiena kontsumitzen da, kasu honetan lehen 48 h-tan ematen delarik. Hortik aurrera, dagoeneko mikroorganismoak ingurunera egokituta daudenez,

egoera egonkor batean aurkituko dira, eta zelulosaren biosintesisirako erabilitako oxigenoaren kontsumoa arinki jaisten da. Azkenik, ingurunean dagoen oxigeno kontsumoa egonkortzen da, bakterioen aktibitatea gutxitzen da eta berarekin batera zelulosaren produkzioa. Emaitza hauek bat datoz aurretik aurkeztutako etekinaren baloreekin, **III.1. Taulan** ikusi den moduan, baldintza estatikoan lehenengo 7 egunetako zelulosa produkzioa azken 7 egunetakoa baino altuagoa da, honela lehen 7

(a)



(b)



III.2. Irudia. Hartzidura-ingurune eta baldintza ezberdinetan disolbaturiko oxigenoa inkubazio denboraren funtziopean: a) g x mL⁻¹-tan eta b) %-tan, hurrenez hurren.

egunetan *DO* kontsumoa askoz altuagoa da bigarren tartean baino. Baldintza ezberdinak konparatuz, baldintza dinamikoan *DO* balio txikiagoak neurtu dira baldintza estatikoan baino biosintesia aurrera doan heinean. Aurretik ikusi da, baldintza dinamikoan, zelulosaren etekina baxuagoa dela eta hori hazkuntza inguruneke baldintzekin erlaziona daiteke, izan ere, baldintza estatikoan, gel itxurako zelulosa mintza, oxigenoan aberatsa den aire eta inguruneak osatzen duten interfasean hazten da eta mikroorganismoek oxigenoa airetik eta ingurunetik har dezakete. Baldintza dinamikoan aldiz, esfera itxurako zelulosa partikulak beraien hazkuntzarako beharrezkoa duten oxigenoa soilik ingurunean bertan disolbaturik dagoen oxigenora mugatzen da eta beraz hau ia guztiz kontsumitzean, zelulosaren hazkuntza ia eteten da. Ingurune ezberdinak konparatuz, ez-ohiko P ingurunean, bai baldintza estatikoan bai dinamikoan, *DO* balio txikiagoak ikus daitezke eta emaitza hauek bat datoz ez ohiko ingurunean lortutako etekin balio altuekin.

Polimerizazio-maila (PM)

Atal esperimentalean deskribatu bezala (II.2.4. sekzioan), *PM* liskatasun neurrien bitartez determinatu da. Lan honetan, kasu guztietan 2600 eta 3000 bitarteko *PM* duten zelulosak lortu dira (**III.2. Taula**).

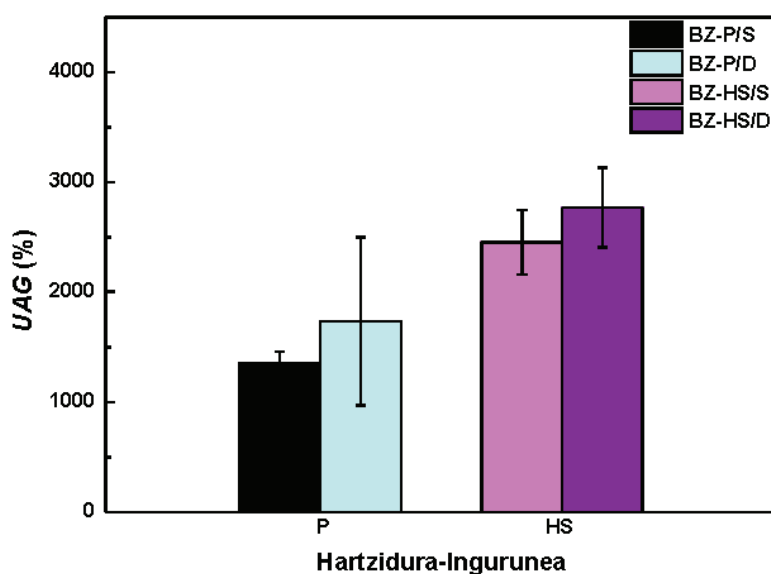
III.2. Taula. Ingurune eta hartidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ lagin ezberdinen polimerizazio-mailak.

Sistema	<i>PM</i>
BZ-P/S	2970 ± 99,0
BZ-P/D	2692 ± 51,6
BZ-HS/S	2780 ± 28,2
BZ-HS/D	2658 ± 7,1

Ikus daitekeen moduan, baldintza dinamikoan *PM* arinki txikiagoak lortu dira. Emaitza hauek, ingurune dinamikoan erabilitako agitazioarekin edota hartidura denborarekin erlazonaturik egon daitezke. Lortutako baloreak bat datoz beste autore batzuk lortutakoekin, zeinak orokorrean 2000 eta 6000 artean izan diren (Nelson eta O'Connor 1964), nahiz eta kasu batzuetan biosintesi baldintzen arabera, 10000 eta 14000 izatera ere iritxi diren (Nelson eta O'Connor 1964; Watanabe et al., 1998).

Ur-atxikipen gaitasuna (UAG)

Mikroorganismoetatik eratorritako mintz edota esfera itxurako zelulosa gel puztuek, hidrogelen antzera, %98-99-ko ur edukia dute. Zelulosaren berezko izaera hidrofiliakoaz gain, *UAG* matrize umelaren barrualdeko azaleran aurkitzen diren hutsuneen menpe dago. BZ aplikazioaren ikuspuntutik, uraren atxikipena garrantziko ezaugarria da (Klemm et al., 2001). **III.3. Irudian**, liofilizatu eta lehortu osteko laginek ura atxikitzeo duten gaitasuna (*UAG*) azaltzen da.

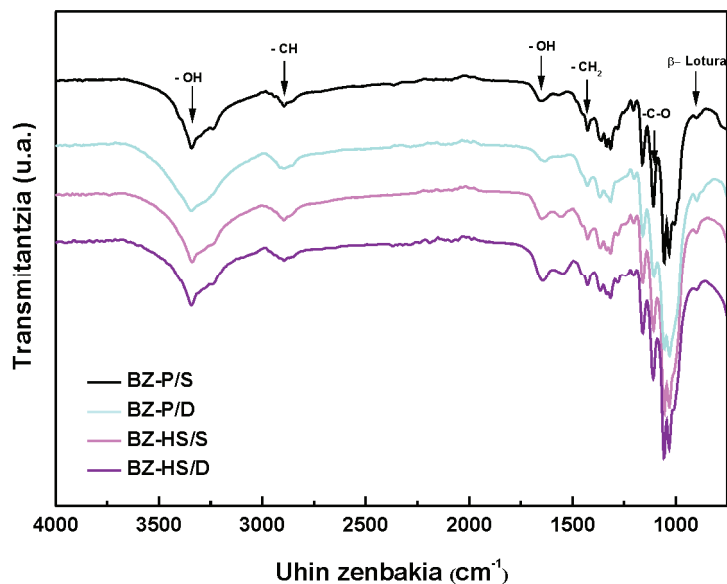


III.3. Irudia. Baldintza estatiko eta dinamikoan, P eta HS hartidura-inguruneetan lorturiko BZ mintzen ur-atxikipen gaitasuna.

Bertan ikus daitekenez, ingurune estandarrean lorturiko zelulosa mintzek ur kantitate handiagoak xurgatzen dituzte. Gainera, ingurune bietan baldintza estatikoan lorturiko balioak apur bat txikiagoak dira. Dirudienez, *UAG*-a, zelulosa mintzaren eta partikulen barneko morfologiarekin, egituraren erregularitasunarekin eta baita nanozuntzek eratzen duten 3D-ko sarean sortzen diren hutsune libre edo poroekin erlazionaturik dago (Watanabe et al., 1998). Hortaz, geroz eta lagin porotsuagoa izan, geroz eta gaitasun handiagoa izango du ura xurgatzeko. UI-Islam et al.-ek esaterako, poro tamaina eta kantitatea txikitzean *UAG*-a ere murrizten zela ikusi zuten (UI-Islam et al., 2012). BZ mintzen analisi morfologikoa *SEM* teknikaren bidez egin da eta II.3.2. sekzioan aztertuko da.

Egitura kimikoa

BZ laginen egitura kimikoaren azterketa *FTIR-ATR* teknikaren bitartez burutu da. Teknika honekin lorturiko espektroak **III.4. Irudian** azaltzen dira.



III.4. Irudia. BZ ezberdinen *FTIR-ATR* espektroak.

Espektro guztiek, zelulosaren zelulosa I egitura esanguratsua erakusten dute (Nelson eta O'Connor 1964; Yamamoto et al., 1996; Huang et al., 2010; Castro et al., 2012). Honela, piku garrantzitsuenak aztertuz, 3300 cm^{-1} inguruan -OH taldeen tentsio bibrazioarekin erlazionaturiko pikua nabarmen da. Halaber, 2990 cm^{-1} -etik 2880 cm^{-1} -ra eta 1462 cm^{-1} -tan aurkitzen diren absortzio pikua CH eta CH_2 tentsio eta flexio bibrazioarekin erlazionaturik daude, hurrenez hurren. 1650 cm^{-1} inguruan ikusi daitekeen pikua, zelulosak xurgatzen duen urari dagokio. $1170\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ tartean agertzen diren pikua zelulosaren zubi glikosidikoaren C-O tentsio bibrazioei dagokie. Bestalde, 897 cm^{-1} -tan glukosan oinarrituriko polimeroek aurkezten duten β loturari atxikitzen den pikua ikus daiteke.

Honez gain, espektro infragorrietan agertzen diren 1427 eta 897 cm^{-1} -tako pikuen azalaren arteko erlazioetik kristaltasun indizea (K^{FTIR}) kalkulatu da (Kataoka eta Kondo, 1998; Ouajai eta Shanks, 2005) eta lortutako kristaltasun indizearen baloreak, **III.3. Taulan** aurkezten dira.

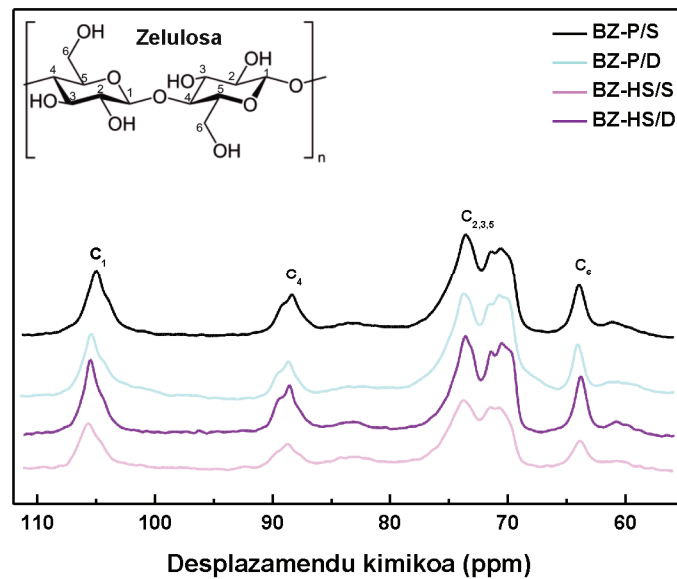
III.3. Taula. Ingurune eta hartzidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ laginen kristaltasun indizeak (KJ^{FTIR}).

Sistema	KJ^{FTIR}
BZ-P/S	3
BZ-P/D	3
BZ-HS/S	4
BZ-HS/D	2

KJ^{FTIR} balioei dagokionez, baldintza estatikoan, 3-4 bitarteko balioak lortu dira eta baldintza dinamikoan aldiz, 2-3 bitartekoak. Hartzidura-inguruneari dagokionez, ez-ohiko ingurunean kristaltasun indize balio berdinak lortu dira, aldiz HS ingurunean baldintza dinamikoan estatikoan baino balio baxuagoa lortu da. Kristaltasun indize balio hauek bibliografian argitaratutakoekin bat datoz. Keshk eta Sameshim-ek, baldintza ezberdinetan lortutako bakterio-zelulosarentzat 3-4 bitarteko KJ^{FTIR} baloreak argitaratu zituzten eta Ouajai eta Shanks-ek kalamu zuntzetan burututako saiakuntzetan 2-tik 4-ra bitarteko balioak lortu zituzten (Keshk eta Sameshima, 2006; Ouajai eta Shanks, 2005).

Honez gain, ingurune eta baldintza ezberdinetako BZ lagin ezberdinen egitura kimikoa, ^{13}C NMR espektrometriaren bitartez aztertu da. **III.5. Irudian** lorturiko espektroak irudikatu dira. BZ lagin guztiek, 110 eta 60 ppm-tako tartean, zelulosaren espektro tipikoa aurkezten dute. Espektroak bat datoz bakterio genero berdinarekin Yamamoto eta Horii-k eta Castro et al.-ek lorturikoekin (Yamamoto eta Horii 1994; Castro et al., 2012). Ikus daitekeenez, 105, 88 eta 64 ppm-tan agertzen diren pikoak, zelulosaren C1, C4 eta C6 karbonoei dagozkie, hurrenez hurren. 78-80 ppm-tako tartean agertzen diren pikoak C2, C3 eta C5 karbono atomoei dagozkie (Yamamoto eta Horii 1994; Castro et al., 2012).

Karakterizazio kimikoaren emaitzek, biosintetizaturiko BZ lagin guztiek izaera kimiko bera dutela baieztatzen dute, baita ere purutasun altuko BZ biosintetizatu dela, edozein hartzidura-ingurune eta baldintzatan.



III.5. Irudia. Baldintza eta ingurune ezberdinetan lorturiko BZ laginen CP-MAS ^{13}C NMR espektoak.

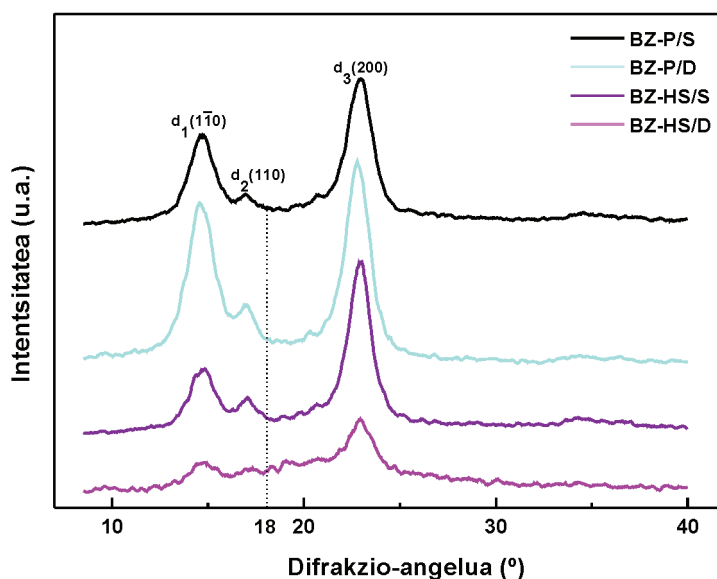
Kristaltasun azterketa

BZ laginen kristaltasun azterketa, *X-izpien* bidez burutu da eta lorturiko difrakzio profilak III.6. Irudian azaltzen dira. Difrakzio profilek jatorrizko zelulosaren egitura kristalino karakteristikoa aurkezten dute, hau da, hiru piku nagusi antzeman daitezke $2\theta = 14,5^\circ$, $16,8^\circ$ eta $22,7^\circ$ -tan ($1\bar{1}0$), (110), eta (200) planoei dagozkienak, hurrenez hurren (Zugenmaier, 2001; Klechkovskaya et al., 2003).

X-izpien difraktogrametik lortutako kristaltasun indizeak (KI^{XRD}), aurreko atalean aipaturiko Segal et al.-ek proposaturiko II.6. ekuazioaren bitartez kalkulatu dira (Segal et al., 1959) $22,7^\circ$ -tako (200) plano kristalografikoari dagokion pikua intensitatea eta 18° -tako zati amorfoak sakabanatutako intensitatea kontuan izanik, eta lorturiko balioak III.4. Taulan aurkezten dira.

Ikus daitekeenez, %75-88 bitarteko KI^{XRD} balioak lortu dira. Orokorrean, taulan azaltzen diren balioak kontutan hartuz, esan daiteke baldintza dinamiko kasuan KI^{XRD} arinki murriztu dela baldintza estatikoarekin alderatuz eta Iwata et al.-ek alde zuzenetik argitaratutakoarekin bat dator (Iwata et al., 1998). Era berean, Gu eta Catchmark-ek baldintza dinamikoan, kristaltasun indize baxuak lortzearen arrazoia, kristal txikiagoko eta gune amorfo gehiagoko zuntz elementalak lortzean datza (Gu eta Catchmark, 2012). Gainera, baldintza dinamikoan erabilitako agitazioak, zelulosa kateen arteko paketatze prozesua eragotzi dezake BZ-ren kristaltasun indizean

eraginez (Shi et al., 2013). Espero moduan, baldintza estatikoan lorturiko bakterio-zelulosak *KI* balio zertxobait altuagoak aurkezten ditu, bai infragorri zein *X-izpi* tekniken bidez lortutako indizeen arabera. Aipatzekoa da *FTIR-ATR* eta *X-izpien* bidez lorturiko balioak joera bera aurkezten dutela. Izan ere, bi tekniken bidez lorturiko *KI* balio altuena BZ-HS/S laginarentzat neurtu da eta txikiena BZ-HS/D laginarentzat.



III.6. Irudia. Baldintza eta ingurune ezberdinetan lorturiko BZ laginen *X-izpien* difrakzio profilak.

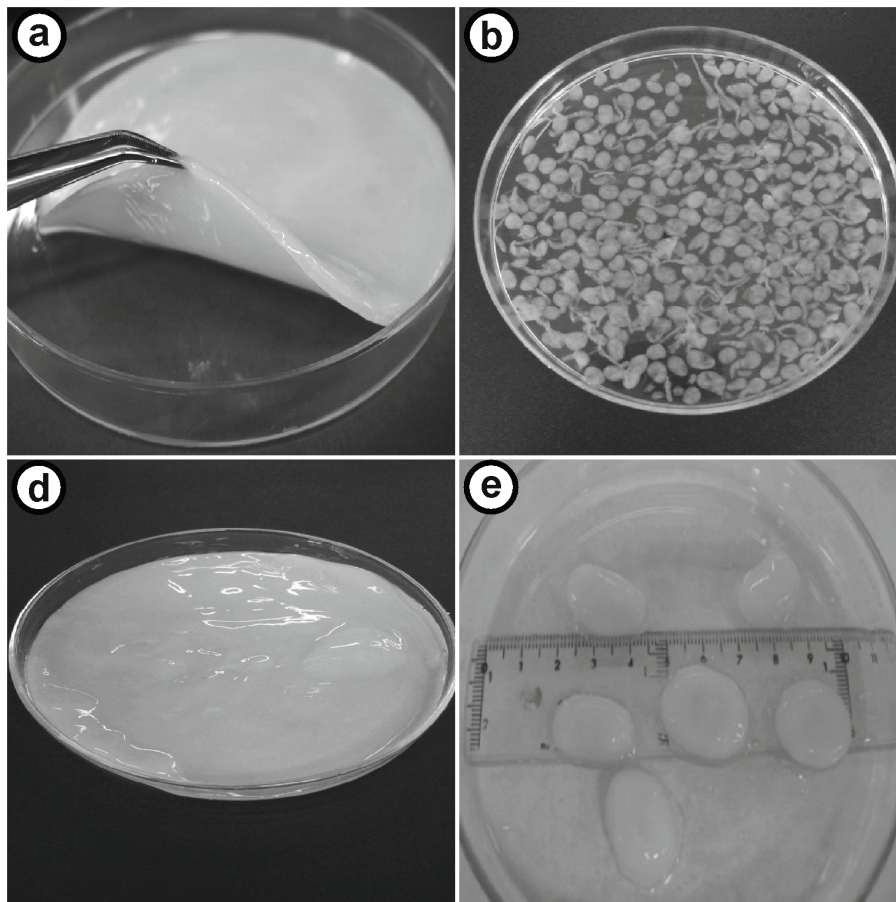
III.4. Taula. Ingurune eta hartxidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ laginen kristaltasun indizeak (KI^{XRD}).

Sistema	KI^{XRD} (%)
BZ-P/S	84
BZ-P/D	83
BZ-HS/S	88
BZ-HS/D	75

III.3.2. Morfologia azterketa

Mintz eta esfera-itxurako zelulosaren morfologiaren azterketa, irudi digital eta *SEM* irudien bitartez egin da. **III.7. Irudian**, lorturiko BZ laginen argazki digitalak azaltzen dira. Baldintza estatikoan, bai P eta bai HS inguruneetan (**III.7a.** eta **III.7d. Irudiak**),

likido/aire interfasean zelulosa mintz gelatinakaria sortzen da, 0,5-1 cm-ko lodierakoa izanik. Bestalde, baldintza dinamikoan, P eta HS inguruneetan (**III.7b.** eta **III.7e. Irudiak**) diametro ezberdinetako esfera-itxurako zelulosa partikula esekiak lortu dira.

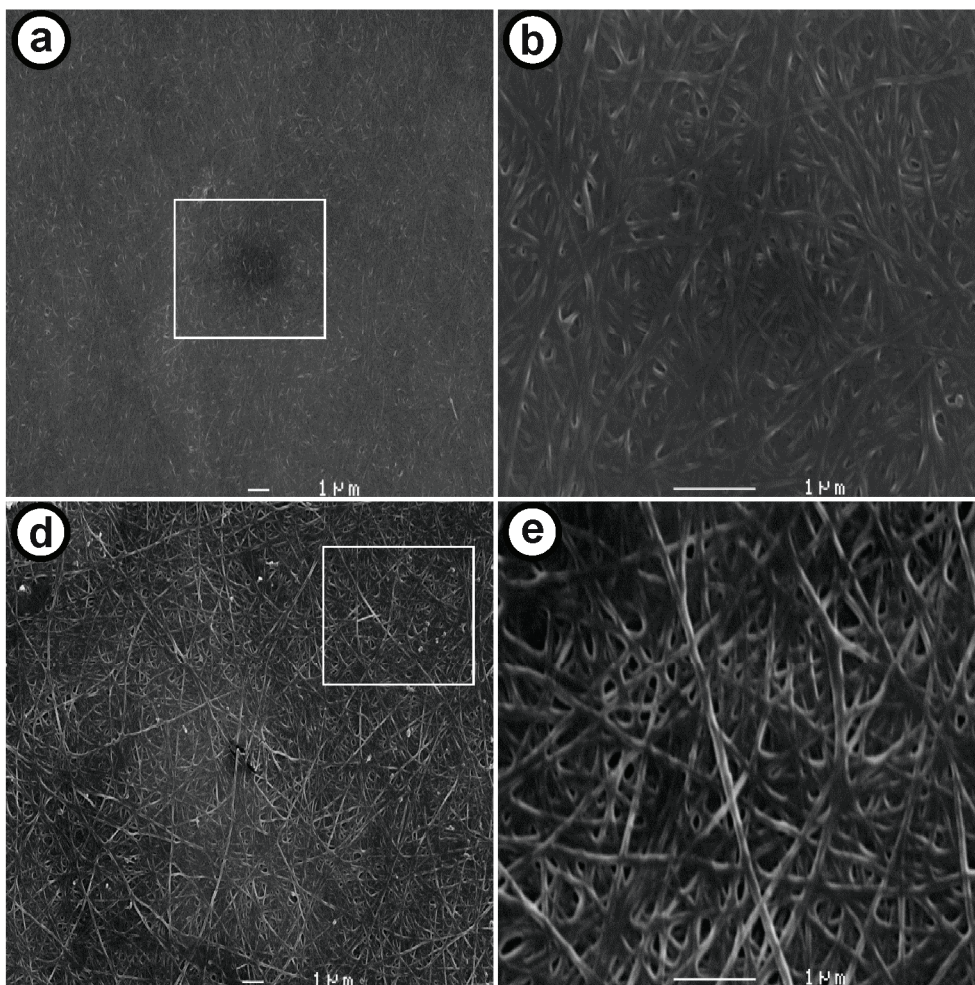


III.7. Irudia. BZ ezberdinen irudi digitalak: a) BZ-P/S, b) BZ-P/D, d) BZ-HS/S eta e) BZ-HS/D.

III.7b. eta **III.7e. Irudietan** ikus daitekeen bezala, baldintza dinamikoan P eta HS hartzidura-inguruneetan lortutako zelulosa partikulen tamainak oso ezberdinak dira, P ingurunean lorturikoak askoz txikiagoak izanik. P ingurunean (**III.7b. Irudia**), 0,2 eta 0,5 cm bitarteko diametroak lortu dira eta HS ingurunean (**III.7e. Irudia**), 1-3 cm-ko diametroak. Balioak, beste autore batzuek lorturikoen antzekoak dira, zeinak baldintza dinamikoan 0,6-0,8 cm bitarteko diametroko esferak lortu zituzten (Ruka et al., 2012). Esfera-itxurako zelulosa partikulen tamaina hartzidura-ingurunearen araberakoa da, eta ondorioz, ingurunearen konposizioarekin erlazonaturik egon daiteke (Watanabe et al., 1998; Gu eta Catchmark, 2012). Aurretik aipatu moduan, P ingurunea HS-rekin aldenuz, karbonotan aberatsagoa denez baliteke zelulosa nukleo kopuru handiagoa eratzeko aukera handitzea. Hortaz, baliteke baldintza dinamikoan karbonoan aberatsak diren inguruneetan, hazkuntza prozesuaren aurrean nukleazioa hobestea, hau da,

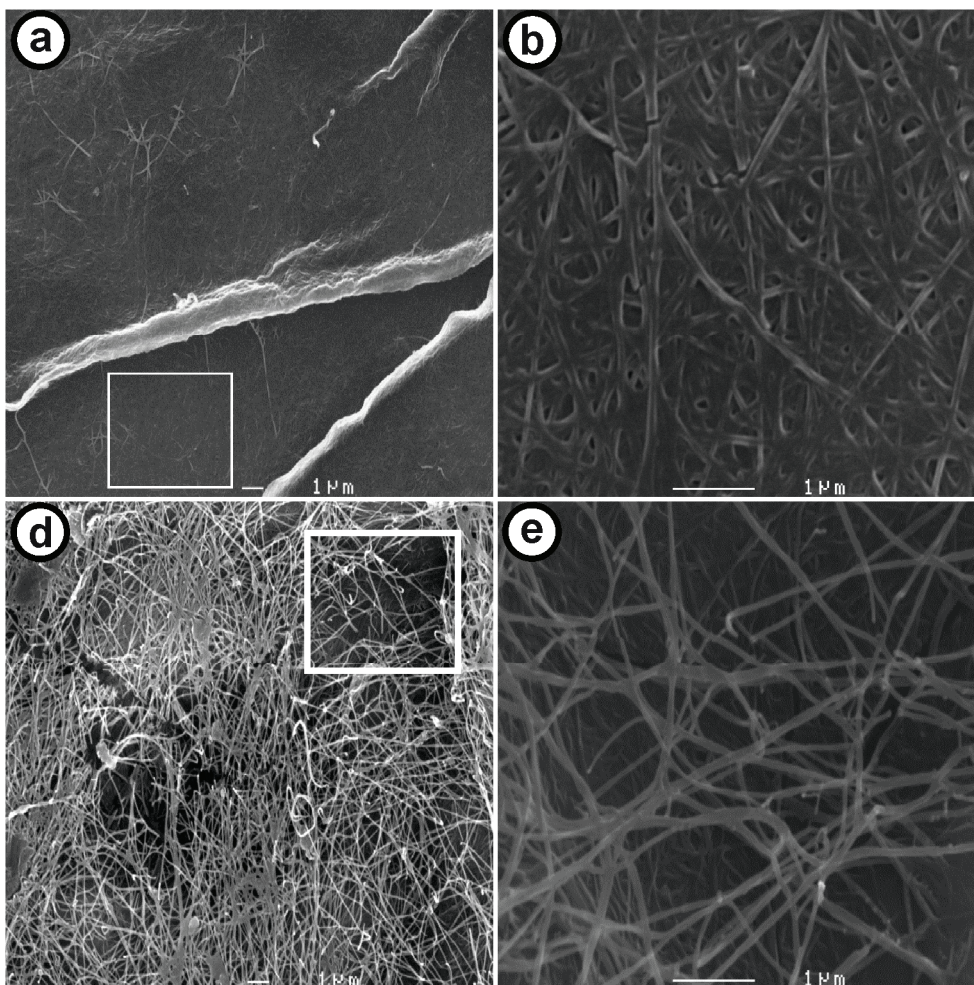
nukleo kopuru handiagoak zelulosa mikrozentzen hazkuntza oztopatzea eta horren ondorioz tamaina txikiagoko zelulosa partikulak lortzea.

III.8. eta III.9. Irudietan baldintza ezberdinetan lortutako BZ laginen gainazaleko SEM mikrografiak aurkezten dira. Kasu guztietan, BZ-ren berezko hiru dimentsiotako sare egitura bereiz daiteke. Baldintza estatikoko nanozuntzen dimentsioak kontutan izanda (**III.8. Irudia**), bi hartzidura-ingurunetan sintetizaturiko zelulosen artean ez da aldaketa nabarmenik ikusten, hauek gutxi gora behera 30-40 nm-tako diametroa dutelarik.



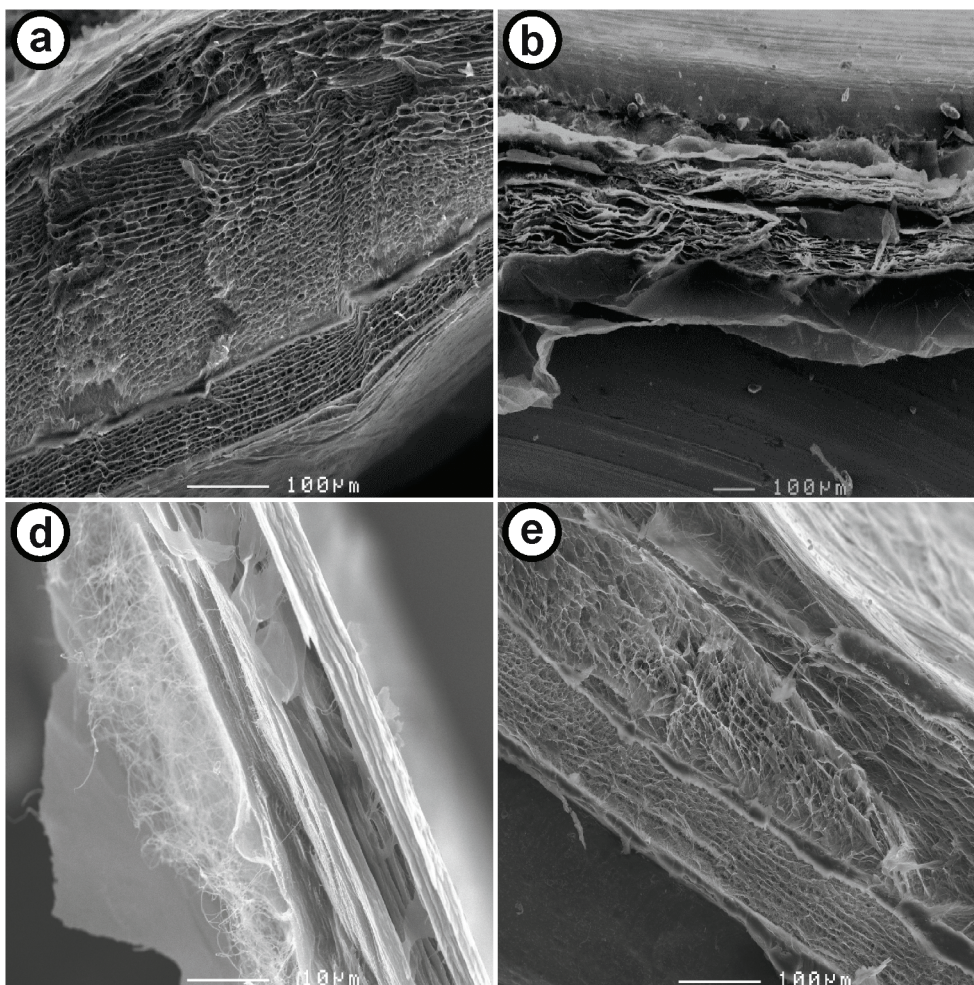
III.8. Irudia. Hartzidura-ingurune ezberdinetan eta baldintza estatikoan lorturiko BZ laginen gainazaleko SEM irudiak: a), b) BZ-P/S eta d), e) BZ-HS/S.

Aldiz, baldintza dinamikoan (**III.9. Irudia**), bai P ingurunean zein HS ingurunean, 40 eta 60 nm bitarteko diametroak lortu dira, hurrenez hurren. Ruka et al.-ek, esaterako 24-55 nm inguruko diametroak lortu zituzten baldintza dinamikoan erabilitako baldintza ezberdinen menpe (Ruka et al., 2012). Beraz, lortutako baloreak bat datozen beste autoreek argitaratutakoekin.



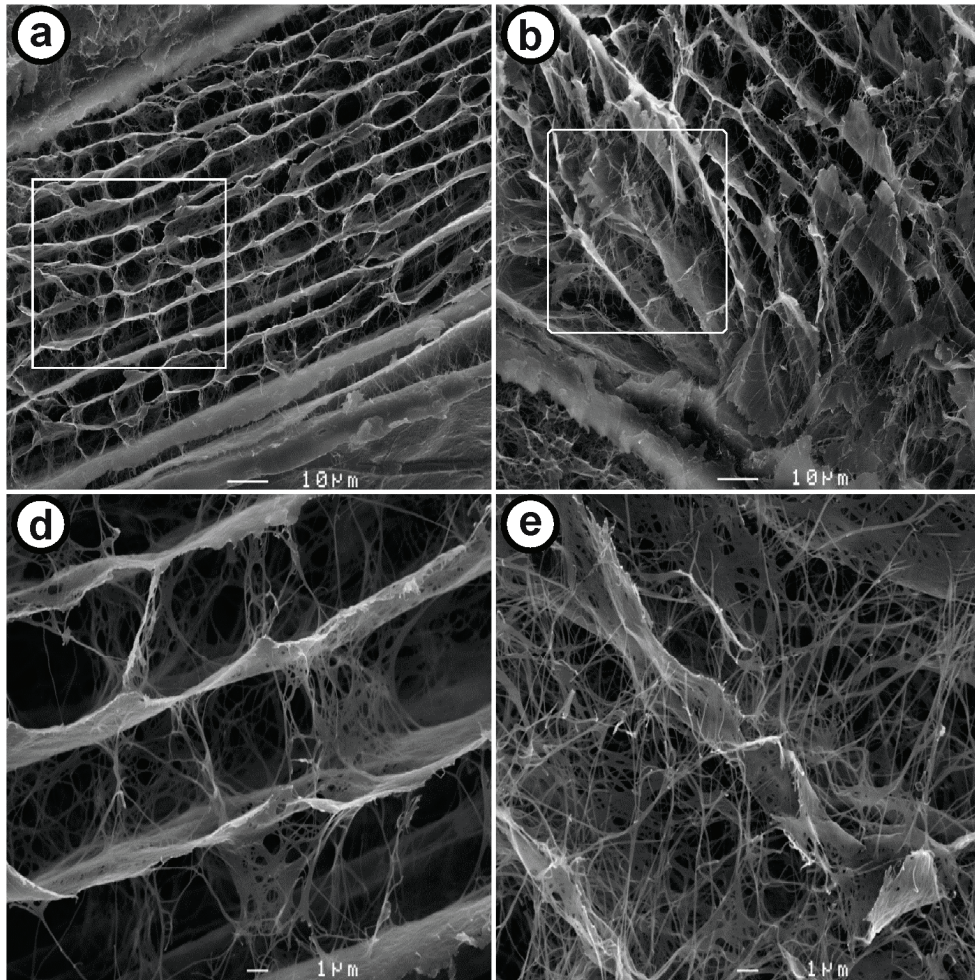
III.9. Irudia. Hartzidura-ingurune ezberdinetan eta baldintza dinamikoan lorturiko BZ laginen gainazaleko SEM irudiak: a), b) BZ-P/D eta d), e) BZ-HS/D.

III.10. Irudian, baldintza estatikoan eta dinamikoan lorturiko BZ laginen zeharkako sekzioaren mikrografiak aurkezten dira. Baldintza dinamikoan lortutako laginetan hutsune kopuru gehiago antzematen da, agitazioak eragindako tentsioek, paketatze prozesua oztopatu dezaketelako. Honela, X -izpien difrakzioaz determinaturiko KJ^{XRD} balio txikiagoekin bat egonik, eta baita beste autore batzuek lortutako emaitzekin ere (Czaja et al., 2004). Baldintza estatikoan biosintetizaturiko zelulosa nanozuntzen diametroak txikiagoak izateaz gain, SEM mikrografiek erakusten dutenez eta baldintza dinamikoan biosintetizatuekin alderatuz, zelulosa sare dentsuagoa osatzen dute, alderik handiena BZ-P/S eta BZ-HS/D laginen artean ikusten delarik. Horretaz gain, lorturiko UAG balioak kontutan izanik, baldintza estatikoan biosintetizaturiko BZ laginen UAG balio txikiagoak bat leudeke SEM irudietan ikusten den zelulosa sare dentsuagoarekin.



III.10. Irudia. Baldintza estatikoan eta dinamikoan lorturiko BZ laginen zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a) BZ-P/S, b) BZ-P/D, d) BZ-HS/S, eta e) BZ-HS/D.

Mintz eta esfera itxurako BZ laginen ezberdintasunak ikusirik eta **III.1.**, **III.2.**, **III.3.** eta **III.4. Tauletan** azaltzen diren propietateen arabera, esanguratsuenak baldintza estatikoan biosintetizaturiko BZ-P/S eta baldintza dinamikoan biosintetizaturiko BZ-HS/D laginen artekoak izanik, hauen barne egitura magnifikazio handiagoarekin lorturiko zeharkako sekzioaren SEM mikrografien (**III.11. Irudia**) bidez aztertu da. **III.11a.** eta **III.11d. Irudian** ikus daitekeen bezala, baldintza estatikoan lorturiko BZ mintzaren mikrografiek BZ-P/S geruza paraleloz osaturiko egitura hierarkiko antolatua aurkezten dute, 0,5-0,6 μm bitarteko distantziaz banandurikoak. Aldiz, baldintza dinamikoan biosintetizaturiko BZ-HS/D laginaren mikrografiek (**III.11b.** eta **III.11e. Irudiak**), ez dute egitura hain antolatua aurkezten dentsuagoa baizik, biosintesi prozesuan erabilitako agitazioari atxiki dakioketelarik.



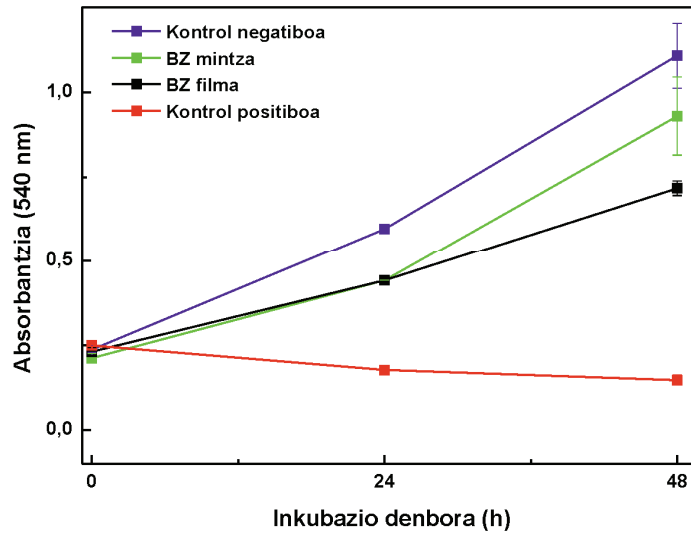
III.11. Irudia. Bi hartidura-baldintza ezberdinetan biosintetizaturiko laginen zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a), d) BZ-P/S eta b), e) BZ-HS/D.

III.3.3. *In vitro* erantzun zelularren azterketa

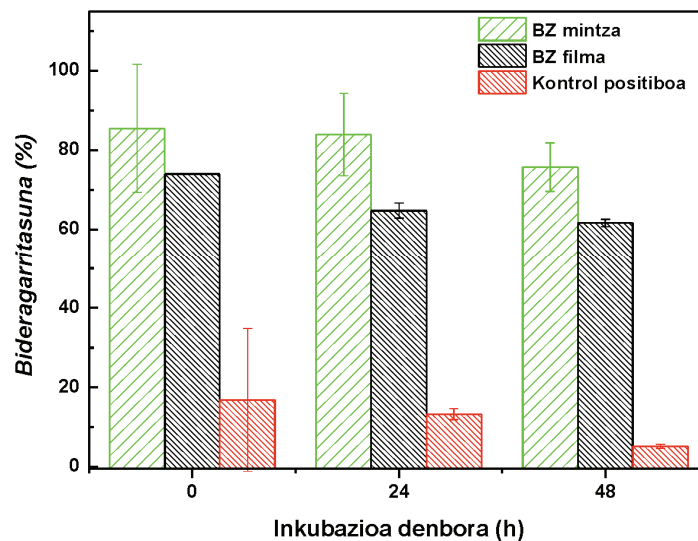
Hazkuntza zelularrean gerta daitezkeen aldaketak aztertzeko, epe motzeko zیتotoxicotasun saiaketak burutu dira, L-929 murino fibroblasto zelulak ez-ohiko ingurunean eta baldintza estatikoan biosintetizatutako zelulosa laginean (BZ-P/S), bai egoera hezean (BZ mintza) bai egoera lehorrean (BZ filma), inkubatuz, 0, 24, eta 48 orduz 37 °C-tan, aurrez 2. atalean azaldu den moduan. BZ-P/S laginak aurkezten dituen propietate eta morfologia direla eta ondorengo ataletan bionanokonpositeen prestakuntzan erabili da. Horregatik, lagin hau aukeratu da *in vitro* erantzun zelularren azterketa burutzeko. **III.12a. Irudian**, entseiu kolorimetrico bidez kontrol positibo bat (PVC) eta kontrol negatiboa bat (HDPE) erabiliz, BZ mintzarentzat zein filmarentzat lortutako absorbantzia balioak ikus daitezke inkubazio denboraren funtziopean. PVC kontrol positiboak, toxikotasun nabarmena aurkezten du, L-929 murino fibroblasto zelulen hazkuntza oztopatuz. BZ mintzak eta BZ filmak ordea,

HDPE kontrol negatiboaren antzekotasun handiagoa duen portaera aurkezten dute, zelulen ugaritzea ematen dela baieztatuz.

(a)



(b)

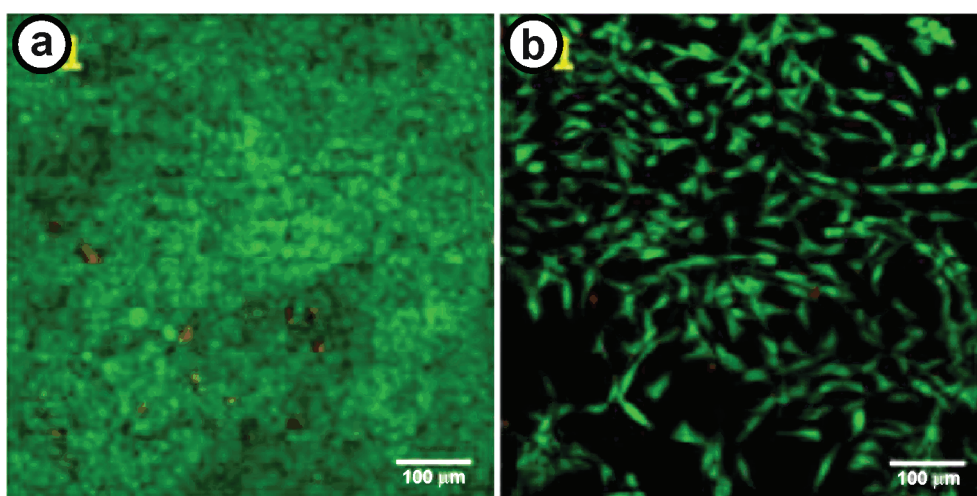


III.12. Irudia. a) Kontrol positiboaren (PVC), kontrol negatiboaren (HDPE), BZ mintz hezearen eta film lehorraren absorbantzia balioak 540 nm-tan inkubazio denboraren funtziopean, eta b) L-929 murino fibroblasto zelulen bideragarritasuna inkubazio denboraren funtziopean.

Bestalde, **III.12b. Irudian**, erantzun zitotoxikoa azaltzen da, kontrol negatiboarekiko zelulen ugaritzea (bideragarritasuna) inkubazio denboraren funtziopean aurkezten da. Argi ikus daiteke, lehenengo 24 h-tan BZ mintzan zelulen bideragarritasuna %70 baino altuagoa dela, BZ filman zertxobait txikitzen delarik. Denbora aurrera joan ahala, zelulen bideragarritasuna ez da asko aldatzen eta inkubazio denbora luzeetan ere, BZ-

mintzaren bideragarritasuna %70-etik gora mantentzen da. ISO 10993 arauak soilik lehen 24 orduak kontuan hartzen dituzenez, atariko entseiu honek BZ mintzak zitotoxikotasunik ez duela adierazten du (ISO, 2009).

III.13. Irudian, kontrol negatiboaren (**III.13a. Irudia**) eta BZ mintza laginaren gainazalean (**III.13b. Irudia**) L-929 murino fibroblasto zelulak erein eta 7 egunez inkubatu ondoren lortutako mikroskopio optiko konfokaleko (*MO*) irudiak aurkezten dira. Ikus daitekeenez, nahiz eta kontrol laginean aurkitzen diren zelula bizi kantitatea (berdez) bezain beste ez izan (**III.13a. Irudia**), BZ mintza laginean zelula biziak ikusten dira (**III.13b. Irudia**).



III.13. Irudia. *Live/Dead* saiakuntza: a) Kontrol negatiboa (HDPE) eta b) BZ mintza laginaren gainazalean, zelula biziak (berdez) eta zelula hilak (gorriz).

III.4. ONDORIOAK

Atal honen helburua, hartidura prozesurako ez-ohiko ingurunea erabiliz, azukre kanabera eta pinaburu hondakin zukuak hain zuzen ere, eta baldintza ezberdinetan, hau da, estatikoan eta dinamikoan, morfologia ezberdineko BZ (mintza eta esfera itxura) ekoiztean datza. Erreferentzia gisa, HS ingurune estandarrean, baldintza estatikoan zein dinamikoan, BZ biosintetizatu da. Ez-ohiko ingurunea lorturiko etekinak ingurune estandarrekin aldentuz altuagoak izan dira P ingurunearen C eduki altua eta azukre anizkoitasuna dela eta. Gainera, *FTIR-ATR* eta ^{13}C *NMR* azterketa fisiko-kimikoari dagokionez, erabilitako edozein baldintzetan, ez-ohiko ingurunean sintetizaturiko BZ-aren ezaugarriak, estandarrean lorturikoaren antzekoak izan dira. Honez gain, esan beharra dago erabili diren ingurune eta baldintza desberdinek BZ morfologian eragina izan dutela. Baldintza dinamikoan, kristaltasun indize, polimerizazio-maila eta etekin txikiagoak lortu dira. Era berean, egitura porotsuagoa

aurkezten dute eta hortaz, ur-atxikipen gaitasun handiagoa. Baldintza estatikoan eta dinamikoan biosintetizaturiko BZ laginek aurkezten dituzten ezberdintasunak, agitazioak eragindako morfologia aldaketei eta disolbatutako oxigenoari besteak beste atxikitzen zaie. Azkenik, epe motzeko zitotoxikotasun saiakerek, BZ mintzen toxikotasun eza aurkeztu dute, beraz biomedikuntza arloko aplikazioetan erabiltzeko material egokia kontsidera daiteke. Hortaz, ez-ohiko ingurunea (pinaburu hondakinak) morfologia ezberdinetako BZ produzitzeko aukera egiaztatzen da, elikagai bezala kostu baxuko hondakinak erabiliaz, balio handiko produktua lortzen delarik eta honekin batera, hondakinen kudeaketan lagunduaz. Iturri berriztagarria izateaz gain, aplikazio ezberdinentzako izan ditzaken aukera paregabeen aurrean, hurrengo ataletan, ez-ohiko hartidura-ingurunea eta baldintza estatikoa erabiliko dira zelulosan oinarrituriko bionanokonposite ezberdinak prestatzeko.

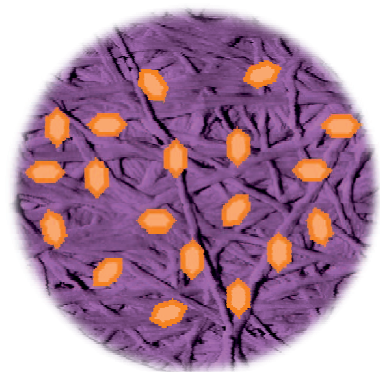
III.5. BIBLIOGRAFIA

- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I. (2012). *Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of Gluconacetobacter genus*. Carbohydrate Polymers, 89, 1033-1037.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Shrikant, A. S., Singhal, R. S. (2009). *Fermentative production of microbial cellulose*. Food Technology and Biotechnology, 47, 107-124.
- Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, R. M. (2004). *Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture*. Cellulose, 11, 403-411.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K. E., Kalis, M. (2010). *Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 1647-1659.
- Embuscado, M. E., Marks, J. S., BeMiller, J. N. (1994). *Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by Acetobacter xylinum*. Food Hydrocolloids, 8, 407-418.
- Gomes, F. P., Silva, N. H. C. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Duarte, M. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Freire, S. R. C. (2013). *Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sacchari using dry olive mill residue*. Biomass and Bioenergy, 55, 205-211.
- Gu, J., Catchmark, J. M. (2012). *Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly*. Carbohydrate Polymers, 88, 547-557.
- Hestrin, S., Scharmm, M. (1954). *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. Biochemical Journal, 58, 345-352.
- Huang, H. C., Chen, C. L., Bin, L. S., Ping, H. C., Huang, C. H. (2010). *In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation*. Bioresource Technology, 101, 6084-6091.
- ISO, 2009, 10993-11:2009 (2009). Biological evaluation of medical devices, Part 11: Tests for systemic toxicity.
- Iwata, T., Indrarti, L., Azuma, J. I. (1998). *Affinity of hemicellulose for cellulose produced by Acetobacter xylinum*. Cellulose, 5, 215-228.
- Kataoka, Y., Kondo, Y. (1998). *FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation*. Macromolecules, 31, 760-764.

- Keshk, S., Sameshima, K. (2006). *The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 291-296.
- Klechkovskaya, V. V., Baklagina, Y. G., Stepine, N. D., Khripunov, A. K., Buffat, P. A., Suvorova, E. I., Zanaveskina, I. S., Takchenko, A. A., Gladchenko, S. V. (2003). *Structure of cellulose Acetobacter xylinum*. Crystallography Reports, 48, 755-762.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S. (2001). *Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery*. Progress in Polymer Science, 26, 1561-1603.
- Kongruang, S. (2008). *Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum strains from agricultural waste products*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 148, 245-256.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., Nakamura, Y. (2009). *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693*. Carbohydrate Polymers, 76, 333-335.
- Nelson, M. L., O'Connor, R. T. (1964). *Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in cellulose I and II*. Journal of Applied Polymer Science, 8, 1325-1341.
- Ouajai S., Shanks, R. A. (2005). *Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments*. Polymer Degradation and Stability, 89, 327-335.
- Ruka, D. R., Simon, G. P., Dean, M. K. (2012). *Altering the growth conditions of Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose*. Carbohydrate Polymers, 89, 613-622.
- Saibuatong, O., Phisalaphong, M. (2010). *Novo aloe vera-bacterial cellulose composite fillm from biosynthesis*. Carbohydrate Polymers, 79, 455-460.
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A., Conrad, C. M. (1959). *An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer*. Textile Research Journal, 29, 786-794.
- Shi, Q. S., Feng, J., Li, W. R., Zhou, G., Chen, A. E., Ouyang, Y. S., Chen, Y. B. (2013). *Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter intermedius BC-41*. Cellulose Chemistry and Technology, 47, 503-508.
- Soong, Y. Y., Barlow, P. J. (2004). *Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds*. Food Chemistry, 88, 411-417.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012). *Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification*. Carbohydrate Polymers, 88, 596-603.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998). *Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture*. Cellulose, 5, 187-200.
- Yamamoto, H., Horii, F. (1994). *In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation cellulose I α and I β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) ^{13}C NMR spectroscopy*. Cellulose, 1, 57-66.
- Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. (1996). *In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I α and I β at the early stage of incubation*. Cellulose, 3, 229-242.
- Zugenmaier, P. (2001). *Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers*. Progress in Polymer Science, 26, 1341-1417.

IV. Atala

BAKTERIO-ZELULOSA ETA MONTMORILLONITA BIONANOKONPOSITEAK



IV. BAKTERIO-ZELULOSA ETA MONTMORILLONITA BIONANOKONPOSITEAK

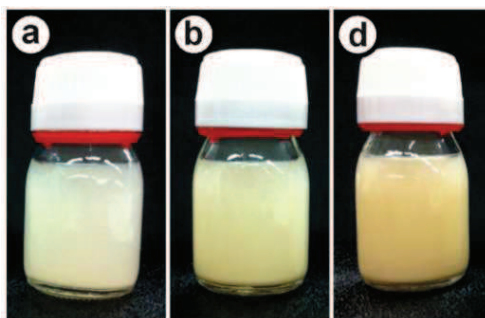
IV.1. HELBURUA

Atal honen helburua bakterio-zelulosa eta montmorillonita (MMT) nanobuztinez osaturiko bionanokonposite hibridoak (BZMMT) lortzea izan da, horretarako *in-situ* polimerizazio metodoa erabiliz. Bakterio-zelulosan oinarrituriko bionanokonpositeen biosintesia, montmorillonita portzentai ezberdinetako dispertsioak hartxidura-ingurunera gehituz burutu da, MMT eduki ezberdina duten BZMMT bionanokonposite hibridoak lortuz. Bakterio-zelulosa bionanokonpositeak sintetizatzeke, III. atalean finkatutako pinaburu hondakin solidoetatik eratorritako ez-ohiko ingurunea eta baldintza estatikoa erabiliko da. Lehenik, portzentai ezberdineko MMT nanokargen ur-dispertsio egonkorak prestatu dira, hartxidura ingurunera gehituz MMT portzentai ezberdinekin indarturiko *in-situ* BZMMT bionanokonpositeak lortuz. Honekin, MMT-ak BZ-ren biosintesian eta propietateengan izan dezakeen eragina aztertu da. Sintetizatutako bionanokonpositeen morfologia, propietate fisiko-kimiko, termikoak, mekanikoak eta iragazkortasun propietateak eta biodegradagarritasuna determinatu dira.

IV.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA

IV.2.1. MMT dispertsioen prestakuntza

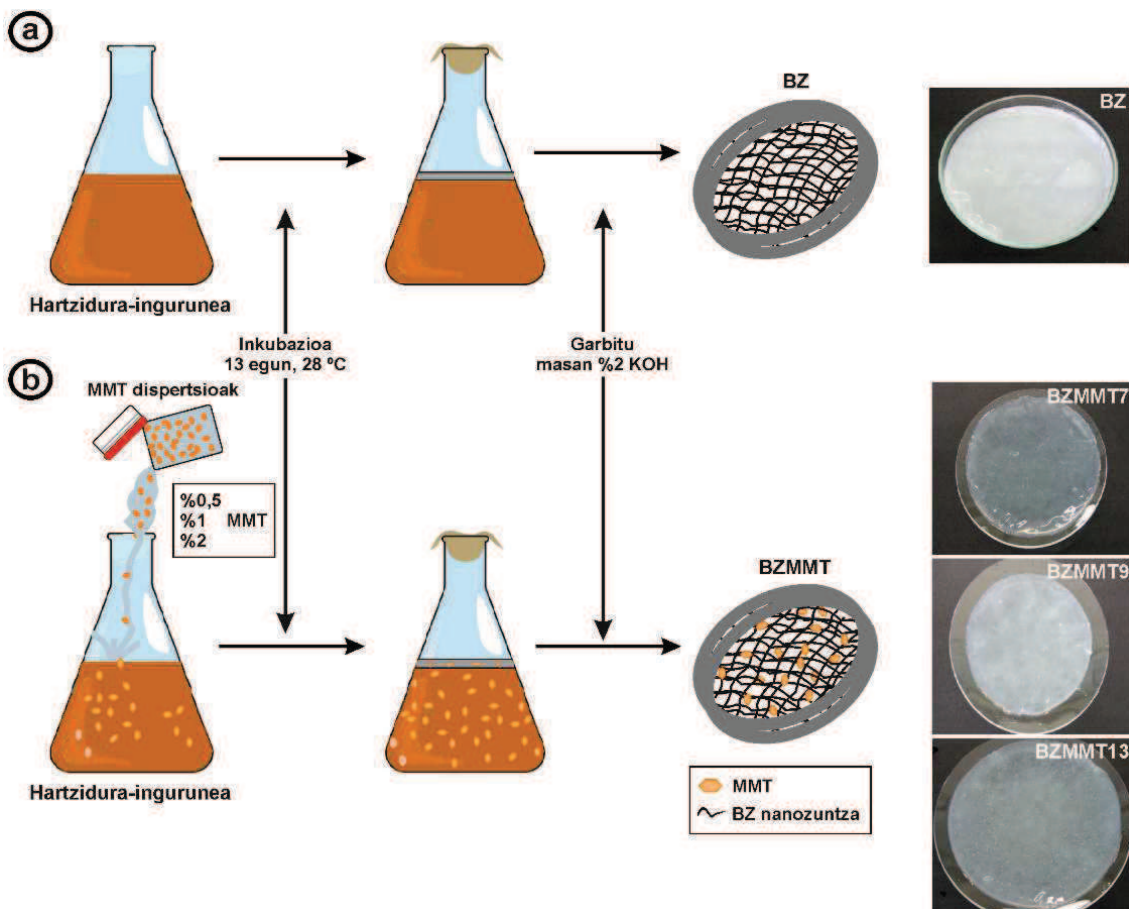
BZMMT bionanokonpositeak lortzeko, lehenik eta behin, masan %0,5, 1 eta 2 MMT kontzentrazioa duten ur-dispertsio egonkorak prestatu dira. Ez dira portzentaia altuagoak prestatu, nanobuztinak ingurunean hauspeatzen baitziren. Nanobuztinak, giro tenperaturan ultrasonikazio (Bioblock Scientific Vibra cell™ 75043) teknikaren bitartez, 60 minututan, 750 W-ko potentzia maximoa eta %20 anplitudea erabiliz dispertsatu dira. **IV.1. Irudian** ikus daitekeen bezala, dispertsioak denborarekin egonkor mantendu dira.



IV.1. Irudia. Ultrasonikazio bidez prestatutako MMT dispertsio ezberdinak: masan (%) a) 0,5, b) 1 eta d) 2.

IV.2.2. BZMMT bionanokonpositeen prestakuntza

III. atalean deskribatutako protokoloa jarraituz, baldintza estatikoan eta pinaburu hondakin solidoetatik eratorritako ingurunea erabiliz, BZMMT bionanokonpositeak sintetizatu dira. Horretarako, MMT/ur-dispersioak (masan %0,5, 1 eta 2 MMT) hartidura-ingurunera gehitu dira eta ondoren, 28 °C-tan 13 egunetan inkubatu dira. Inkubazio denbora ondoren, ingurunearen likido/aire interfasean BZMMT mintza eratzen da. Erreferentzi gisa, BZMMT bionanokonpositeen baldintza berdinetan, BZ mintza ere biosintetizatu da. **IV.2. Irudian**, bionanokonpositeen prestaketan jarraituriko protokoloaren eskema bat azaltzen da, baita ere garbitu ostean lorturiko mintzen argazkiak.



IV.2. Irudia. Mintz ezberdinen prestakuntzan jarraituriko protokoloaren eskema eta lorturiko laginen irudi digitalak: a) BZ mintza eta b) BZMMT mintz hibridoak.

Ingurunean aurkitzen diren zelula edota ezpurutasunak kentzeko, mintzak aurretik aipaturiko (III. ataleko III.2.1.sekzioan) alkali tratamendua erabiliz garbitu dira. Lorturiko BZ eta BZMMT mintzen konpresioz filmak prestatu dira. Horretarako, prentsa hidrauliko bat erabili da 10 MPa-ko presioan, 60 °C-tan eta 5 minututan, presioa aplikatuz gehiegizko ura ezabatzeko.

IV.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

IV.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa

MMT edukia

Lehenik, II.2.6. sekzioan azalduko LA-ICP-MS teknikaren bitartez, BZMMT mintz hibridoaren MMT edukia kalkulatu da. Lorturiko balioak **IV.1. Taulan** biltzen dira.

IV.1.Taula. BZMMT mitz hibridoaren MMT edukia.

MMT dispersioaren kontzentrazioa (%)	Bionanokonpositeen MMT edukia (%)	Sistema
0,0	0	BZ
0,5	7	BZMMT7
1,0	9	BZMMT9
2,0	13	BZMMT13

Taulan ikus daitekeen moduan, MMT eduki ezberdineko bionanokonposite hibridoak prestatu dira. Hortaz, MMT edukiaren arabera BZMMT7, BZMMT9 eta BZMMT13 bezala izendatuko dira. Ikus daitekeenez, dispersioeko MMT edukia handitzean, bukaerako bionanokonposite hibridoan MMT kontzentrazioa handitzen da. Yan et al.-ek, antzeko emaitzak lortu zituzten baldintza dinamikoan hartidura-ingurunera horma anitzeko karbono nanohodiak gehitzean (MWCNT), non dispersioeko MWCNT kontzentrazioa handitzean lortutako nanokonpositeetan MWCNT edukia handitzen zen (Yan et al., 2008).

Etekinak

IV.2. Taulan hartidura-ingurune ezberdinetan lorturiko etekinak biltzen dira. Ikus daitekeen moduan, BZMMT mintzen etekinak BZ puruarenak baino baxuagoak dira. Emaita hauek bat datoz beste autore batzuek argitaratutakoekin, zelulosaren biosintesian gehigarriek eragina dutela ikusiaz. Ruka et al.-ek ere hidroxipropilmetil zelulosa (HPMC) gehigarri bezala erabiltzean, BZ-ren etekina %31-n gutxitzen zela ikusi zuten (Ruka et al., 2013). Argitaratua izan denez, hainbat gehigarri, zelulosaren sintesia oztopatu dezakete, zelulosa produkzioan nanozuntzen arteko paketatzea eragotziz (Benziman et al., 1980), eta hori dela eta zelulosaren etekina murriztu. Hala

ere, BZMMT bionanokonposite hibridoetan sintetizaturiko mintzen etekinak elkarren artean konparatuz, handitze bat pairatu da, gehitutako dispersioaren MMT kontzentrazioa %0,5-etik %2-ra handitzean. Ruka et al.-en arabera, etekin handitze hau, ez da zelulen hazkuntza tasaren estimazioaren ondorioz gertatzen, gehigarria filmean erantsi delako baizik eta horregatik laginaren masa handitzen da (Ruka et al., 2013).

IV.2.Taula. BZMMT mintzen biosintesian lortutako etekinak.

Sistema	Etekinak (g x L⁻¹)
BZ	3,46 ± 0,01
BZMMT7	1,32 ± 0,00
BZMMT9	1,37 ± 0,03
BZMMT13	1,62 ± 0,01

Porotasuna eta ur-atxikipen gaitasuna

Montmorillonita nanobuztinek BZMMT bionanokonposite filmeen porotasunarengan eta ur-atxikipen gaitasunarengan duten eragina aztertu da. Balioak **IV.3. Taulan** aurkezten dira.

IV.3.Taula. BZ eta BZMMT bionanokonpositeen porotasuna eta UAG balioak.

Sistema	P (%)	UAG (%)
BZ	12,03 ± 0,04	692 ± 81
BZMMT7	11,83 ± 0,33	1923 ± 197
BZMMT9	9,87 ± 0,70	2653 ± 6
BZMMT13	6,33 ± 0,07	3460 ± 144

Porotasuna, II.2.7. sekzioan azaldu den bezala, mintzen dentsitateak determinatuz kalkulatu da, $\rho_{zelulosa} = 1,592 \text{ g x mL}^{-1}$ eta $\rho_{nanobuztina} = 1,700 \text{ g x mL}^{-1}$ balio teorikoak erabiliz. Ikus daitekeen bezala, bionanokonpositeak porotasun balio txikiagoak erakusten dituzte BZ-rekin alderatuz, arinki txikituz MMT eduki txikienean eta nabarmen MMT portzentaia handitzean. Emaidza hauek, hartzidura-ingurunera MMT

gehitzeak eragina duela baieztatzen dute, non egitura konpaktuagoak lortzen direla iradokitzen duten. Honez gain, BZ-ren eta BZMMT bionanokonposite ezberdinen, ur-atxikipen gaitasuna aztertu da. Ikus daitekeenez, MMT-aren kontzentrazioa handitzen doan heinean, *UAG* balioa handitzen doa. Nahiz eta, zelulosaren izaera hidrofilikoa eta BZ-ren *UAG* altua ezagunak diren, MMT nanobuztina gehitzean (hidrofilikoa baita ere), balio altuagoak lortzen dira. Badira kontrako emaitzak lortu dituztenak, esaterako, Ul-Islam et al.-ek (Ul-Islam et al., 2012a). Kasu honetan, nahiz eta hutsune libre gutxiago izan, porotasunaren jaitsierarekin lotuta, MMT hidrofilikoarekin presentziari esker materialak ur gehiago xurgatzeko gaitasuna du eta ondorioz, *UAG* balio altuagoak lortzen dira.

Gardentasun azterketa

BZMMT laginen gardentasunean MMT-aren gehikuntzak duen eragina izpi ultramore-ikuskorreko espektroskopia teknikaren bitartez aztertu da. Horretarako, konpresioz lorturiko filmak zuzenean ikuskatu dira. **IV.3. Irudian**, lorturiko bionanokonpositeen irudi digitalak azaltzen dira eta itxuraz ez dirudi MMT eduki ezberdinek gardentasunean aldaketa handirik eragiten duenik.



IV.3. Irudia. Sintetizaturiko osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite film hibridoaren irudi digitalak: a) BZ, b) BZMMT7, d) BZMMT9 eta e) BZMMT13.

Hala ere, gardentasunaren analisi zehatzagoa izatearren, *UV-ikus* espektrofotometroaren bidez BZ osagai puruaren eta bionanokonposite hibridoaren absorbantzia espektroak lortu dira. Ondoren, lagin hauen propietate optikoak era objektibo batetan kuantifikatzeko asmoarekin, opakotasun balioak II.7. ekuazioa erabiliz kalkulatu dira eta **IV.4. Taulan** azaltzen dira.

Ikus daitekeenez, BZMMT bionanokonpositeen opakotasunaren handitzea oso nabarmena ez bada ere, MMT edukiarekin handitzen da, MMT nanobuztin xafletan argi ultramore ikuskorraren dispersioa eta absorzioa dela eta. Tunç eta Duman-ek, esaterako, metil zelulosa eta MMT konpositeak inpregnazioz prestatu zituzten, MMT

kontzentrazio ezberdinekin (masan %20, 40 eta 60-ko MMT kontzentrazioak), eta kontzentrazioa handitzen zihoan heinean opakotasuna handitzen zela ikusi zuten (Tunç eta Duman, 2010). Baita, Slavutsky et al.-ek, goma bati masan %0-5 bitarteko MMT kantitatea gehitzean opakotasunaren handitzea ikusi zuten (Slavutsky et al., 2014). Aipatzekoa da MMT portzentai baxuko hibridoek BZ-rekiko antzeko opakotasunak dituztela, dispersio ona lortu dela iradokitzen dutelarik.

IV.4.Taula. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren opakotasun balioak.

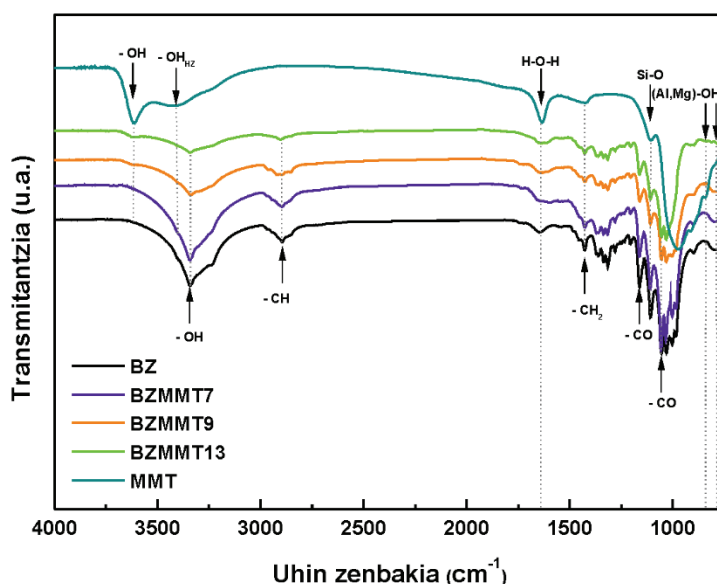
Sistema	OP (u.a. x mm⁻¹)
BZ	4,43 ± 0,06
BZMMT7	4,67 ± 0,20
BZMMT9	5,30 ± 0,04
BZMMT13	6,08 ± 0,10

Egitura kimikoa

BZMMT bionanokonpositeetan egon daitezkeen BZ eta MMT arteko elkarrekintzak *FTIR-ATR* bitartez aztertu dira. **IV.4. Irudian**, BZ eta MMT puruaren zein BZMMT bionanokonpositeen *FTIR-ATR* espektroak azaltzen dira.

BZ puruaren kasuan, III. atalean ikusi bezala, zelulosaren piku karakteristikoak ikus daitezke, hau da, 3444 cm⁻¹ eta 2896 cm⁻¹-tan -OH eta -CH₂ eta -CH talde funtzionalen tentsio bibrazioarekin erlazonaturik daudenak hain zuzen ere. Honez gain, -CH₂ taldeari atxikitutako pikua, 1462 cm⁻¹ uhin zenbakian antzeman daiteke. Beste piku garrantzitsu batzuk, 1170 cm⁻¹-etik 1050 cm⁻¹-tara, C-O taldearen tentsio bibrazioari dagokie, hots, zubi glikosidikoarekin loturiko pikua dira. Horietaz gain, 897 cm⁻¹-tan glukosan oinarrituriko polimeroetan azaltzen den β loturari atxiki dakioken pikua bereiz daiteke (Nelson eta O'Connor 1964; Yamamoto et al., 1996; Kataoka eta Kondo, 1998; Ouajai eta Shanks, 2005; Huang et al., 2010). Bestalde, MMT espektroaren piku nagusienak 3700-3400 cm⁻¹ uhin zenbaki tartean aurkitzen dira, zeinetan 3615 cm⁻¹ eta 3414 cm⁻¹ piku esanguratsuak aurkezten diren, -OH taldearen tentsio bibrazioari dagozkionak, non geruzen arteko eta barrualdeko geruzei dagokien hidrogeno zubi loturez elkarturiko -OH taldeei dagokien, hurrenez hurren. Honez gain, 1630-1650 cm⁻¹-tako tartean, H-O-H taldearen flexio bibrazioari, hau da, laginak

absorbaturiko ur molekulei dagokion pikua azaltzen da (Alemdar et al., 2005; Günister et al., 2007). Bestalde, Si-O taldearen tentsioari dagokion bibrazio pikua gutxi-gora-behera 1110 cm^{-1} uhin zenbakian bereizten da (Russell eta Fraser, 1994; Madejová eta Komadel, 2001). Honez gain, 838 cm^{-1} eta 792 cm^{-1} -tan (Al, Mg)-OH elementuen flexio bibrazio pikua azaltzen da (Alemdar et al., 2005; Günister et al., 2007). BZMMT bionanokonpositeetan, BZ-ren zein MMT-ren piku esanguratsuak bereiz daitezke. MMT eduki handieneko bionanokonpositeetan, BZMMT9 eta BZMMT13-an hain zuzen ere, 3621 cm^{-1} -ko uhin zenbakian MMT puruaren pikua azaltzen da. Honez gain, $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ -tan, BZ eta MMT puruan agertzen diren C-O-C eta Si-O loturei dagokien pikuak bereiz daitezke. Hortaz, *FTIR-ATR* espektroen bitartez BZMMT bionanokonposite hibridoak eratu direla baieztatu daitezke osatzen duten osagaien piku esanguratsuenak azaltzen direlarik.

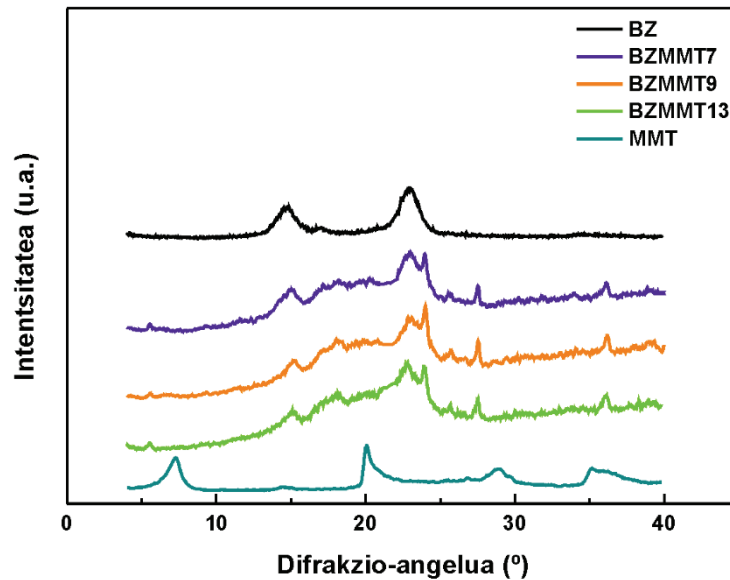


IV.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren *FTIR-ATR* espektroak.

Kristaltasun azterketa

BZ-ren biosintesian MMT-a gehitzeak, zelulosaren biosintesian era ezberdinetan eragin dezake, izan ere I. atalean ikusi den moduan gehigarriek BZ-ren biosintesi prozesua eralda dezakete, besteak beste kristalizazio prozesuan eraginez eta ondorioz, propietate kimiko eta fisikoak aldatuz. *XRD* teknika, zelulosa molekulen antolaketa eta kristaltasun indizea aztertzeko erabiltzen da. Gainera, *XRD* MMT-an oinarritutako bionanokonpositeen egitura tartekatua eta esfoliatua aztertzeko erabiltzen

da. **IV.5. Irudian**, BZ eta MMT puruaren zein BZMMT bionanokonposite film hibridoen XRD difraktogramak azaltzen dira.



IV.5. Irudia. X-izpien bidez lortutako BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoen difrakzio profilak.

BZ-ren difraktograma, aurreko atalean aipatu moduan zelulosa I alomorfoari dagokio ($2\theta = 14,5^\circ$, $16,8^\circ$ eta $22,7^\circ$). MMT-ren XRD difraktograman, $7,1^\circ$ -ko difrakzio-angeluan agertzen den difrakzio pikua, Bragg's ekuazioaren bitartez, geruza arteko espazioa kalkulatzeko erabili daiteke (Borosysiak eta Garbarczyk, 2003; Jin et al., 2007). Lorturiko balioa 1,25 nm-koa izan da, eta bat dator hornitzaileak emandako 1,22 nm-ko espazioarekin. BZMMT bionanokonposite hibridoen kasuan, $2\theta = 7,1^\circ$ -an ez da pikurik ikusten, horregatik MMT geruzak BZ mintzetan egitura tartekatua/esfoliatua osatuz dispertsio egokia dutela esan daiteke. Jakina da, tartekaturiko nanokonposite baten egituren, geruza anitzeko nanobuztin mineralen egitura errepikakorra mantentzen dela eta geruzaren arteko espazioa determinatu daiteke. Normalean, polimeroen kateak geruzen artean tartekatzean nanobuztin geruzen arteko oinarrizko espazioa handitzen da eta ondorioz, difrakzio pikua angelu balio baxuagotara desplazatzen da (Alexandre eta Dubois, 2000). Aldiz, bionanokonpositeen egitura esfoliatu batetan, XRD difraktograman nanobuztin geruzen difrakzio pikua desagertzen da, silikato geruzen antolamendu eza dela medio (Wang et al., 2005; Tunç eta Duman, 2010). Liu eta Berglund-ek, nakar itxurako MMT/zelulosa nanozuntzean oinarrituriko nanopaper bat prestatu zuten, nahasketa mekanikoa eta kitosanoa erabiliz MMT-aren dispertsioa hobetzeko (Liu eta Berglund, 2012). Bertan, XRD-z xafen arteko distantzia

handitzen zela ikusi zuten, kitosanoa MMT geruzen artean tartekatua aurkitzen zenaren adibide, alabaina ez zuten egitura esfoliatuak lortu. UI-Islam et al.-ek, BZMMT konpositeak prestatu zituzten BZ mintzak MMT kontzentrazio ezberdinetako dispersioetan inpregnatuz eta konposite guztietan *XRD* difraktograman 8-9° bitartean piku bat ikusi zuten, MMT-aren presentzia eta maila batean egitura mantentzen zela frogatuz eta soilik intentsitate jaitsiera edo angelu baxuetara desplazamendu bat antzeman zuten (UI-Islam et al., 2012b). Emaitza hau, nanobuztin xaflen geruzen arteko delaminazio partzialarekin erlazionaturik egon daiteke. Hortaz, lan honetan lortutako emaitzak kontutan izanik, BZ-ren biosintesi prozesua burutzen ari den bitartean MMT txertatzeak, hau da, *in-situ* eraldaketak, hobekuntza nabarmena izan dezake MMT konpositeen prestakuntzan, batez ere lortu den esfoliazio eta dispersio maila altuagatik. Hala ere, dispersio maila altu hau konfirmatzeko aurrerago azalduko den morfologia azterketa burutu da (IV.3.4. sekzioa).

Aurretik aipatu moduan, BZ-ren biosintesi prozesuan MMT-a gehitzeak, zelulosaren kristaltze prozesuan eragin dezake. Analisi kuantitatibo bat burutzeko asmoz sistema bakoitzaren kristaltasun indizeak kalkulatu dira. *XRD* profiletik kalkulatu diren kristaltasun indizeen (KI^{XRD}) balioak **IV.5. Taulan** aurkezten dira.

IV.5.Taula. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren kristaltasun indizeak (KI^{XRD}).

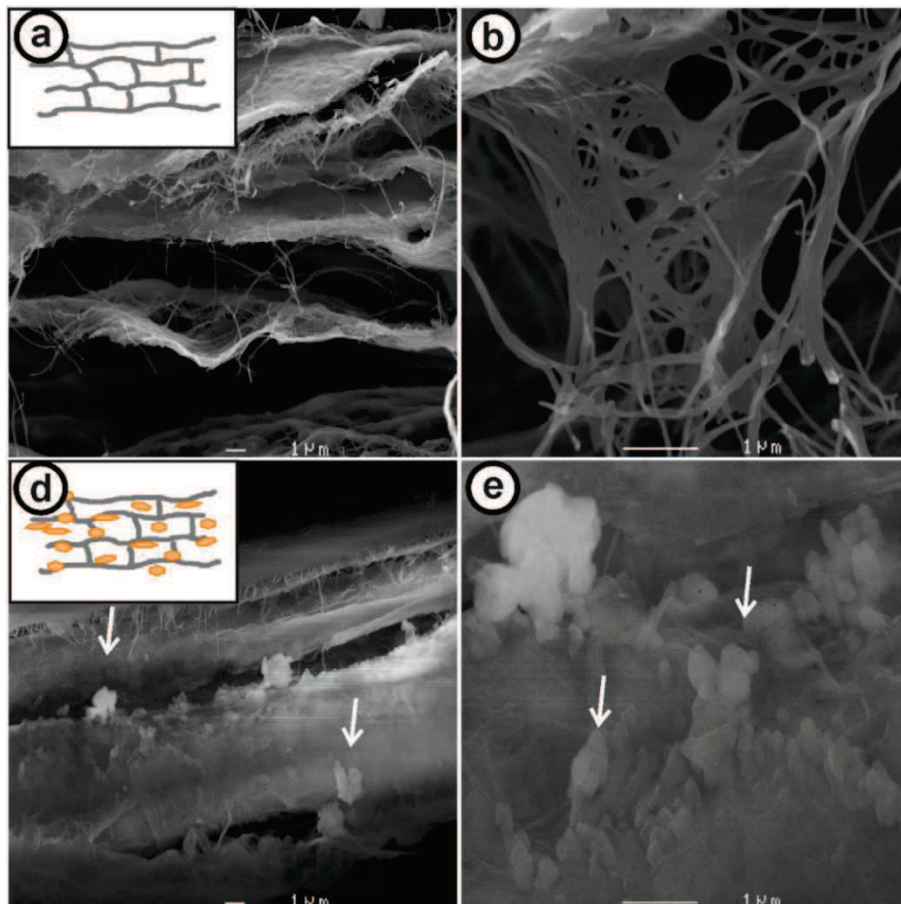
Sistema	$KI^{XRD}(\%)$
BZ	85
BZMMT7	84
BZMMT9	84
BZMMT13	77

Aipatzekoa da BZ-ren KI^{XRD} balioa **III.4.Taulan** agertzen dena baino arinki handiagoa dela, arrazoia laginen prestakuntza izanik. Aurreko ataleko balioak liofilizaturiko laginei dagozkie eta kasu honetan konpresio bidez lorturiko filmei, eta aurretik aztertua izan da, konpresioak eta tenperaturak, zelulosa filmen kristaltasuna handitzen duela (Retegi et al., 2010). Ikus daitekeenez, BZ puruaren KI^{XRD} %85 da eta BZMMT7 eta BZMMT9 bionanokonposite hibridoetan zertxobait jaitsi arren, kristaltasun indize balio altuak mantentzen dira. Aldiz, BZMMT13 bionanokonpositean kristaltasun balioa %77-ra jaisten da. Honek, MMT-ak zelulosaren biosintesian eragina duela

baieztatzen du, porotasunean edo eta ur-atxikipen gaitasunean ikusi den bezala. Emaiza hauek, bat datoz beste ikerketa batzuekin, non hartidura-ingurunean gehigarriak erabiltzean, BZ-ren kristalen edo kristaltasun aldaketak ikusi diren. Ruka et al.-ek esaterako, poli-3-hidroxi-butiratoan eta bakterio-zelulosan oinarritutako konpositea prestatu zuten *in-situ* eraldaketa metodoaren bitartez eta lorturiko nanokonpositeen kristaltasunak txikitze nabarmena pairatu zuten (Ruka et al., 2013). Beste autore batzuek argitaratu dutenez, joera hau BZ nanozuntzetan dauden zutz elementalen eta biosintesia bitartean hartidura-ingurunera gehituriko gehigarrien artean sortzen diren interakzioekin erlaziona daiteke (Cheng et al., 2009).

IV.3.2. Morfologia azterketa

SEM bidezko analisisia *XRD* teknikaren osagarria da bionanokonpositeen egitura eta morfologia aztertzeko. **IV.6. Irudian**, BZ puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibrido baten, BZMMT9 hain zuzen, zeharkako sekzioaren *SEM* mikrografiak azaltzen dira. BZ puruaren kasuan (**IV.6a.** eta **IV.6b. Irudiak**), zelulosa nanozuntz askeek geruza ezberdinetako egitura osatzen duten bitartean, BZMMT9 bionanokonposite



IV.6. Irudia. Liofilizaturiko mintzen zeharkako sekzioaren *SEM* irudiak:
a), b) BZ eta d), e) BZMMT9.

hibridoan egitura trinkoagoa antzematen da (**IV.6d.** eta **IV.6e. Irudiak**). Zeharkako sekzioan ikusi diren egitura ezberdintasunak (**IV.6a.** eta **IV.6d. Irudiak**), BZ puruaren eta lagin hibridoetan neurtu diren porotasun balioekin bat datoz. SEM irudietan, zelulosa nanozuntzak MMT nanobuztin xaflez estalita dirudite.

IV.3.3. Azterketa termikoa

Analisi termograbitmetrikoa

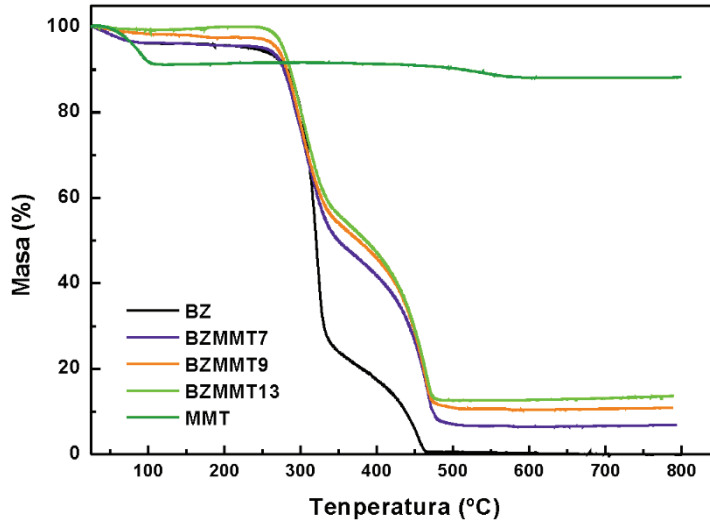
BZ eta BZMMT film hibridoen egonkortasun termikoa analisi termograbitmetrikoaren bitartez aztertu da. **IV.7. Irudian**, BZ zein MMT puruek eta BZMMT bionanokonpositeek tenperaturarekiko aurkezten duten masa galerak irudikatu dira. TGA saiakuntzak (**IV.7a. Irudia**) 25-800 °C bitartean oxigenotan burutu dira. MMT-aren termograman 25-100 °C-tan masa galera nabarmen bat ikus daiteke (%9), nanobuztinek duten izaera hidrofilikoen ondorioz xurgaturiko urari dagokiona. Honez gain, MMT nanobuztinak duen mineral kantitate altuari esker (masan %70 arte), egonkortasun termiko altua aurkezten du 600 °C inguru arte, non masa galera txiki bat ikusten den, bukaerako errauts hondakina masan %97 baino altuagokoa izanik hezetasunaren galera ondoren. BZ-ren degradazio termikoari dagokionez, hiru etapetan ematen da. Lehen etapan, BZ-ren deshidratazioa gertatzen da (80-120 °C), bigarrenetan depolimerizazioa (250-400 °C) eta azken etapan unitate glikosidikoen deskonposizioa (> 400 °C) (George et al., 2011).

BZMMT bionanokonposite hibridoetan, BZ-ren degradazio etapa berdina bereizten dira. **IV.6. Taulan**, hezetasun-edukiarekin erlazionaturiko masa galera, DTGA kurbetatik (**IV.7b. Irudia**) lorturiko hasierako depolimerizazio tenperatura (%5-eko masa galerari dagokiona) eta maximoa (T_{01} eta T_{max1}), unitate glikosidikoen hasierako eta deskonposizio maximo tenperaturak (T_{02} eta T_{max2}) eta 800 °C-tan errauts portzentaiak, hurrenez hurren azaltzen dira.

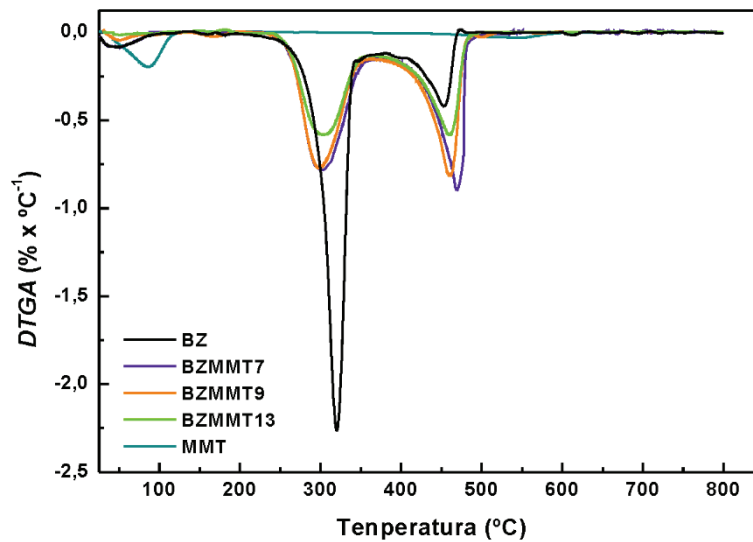
Ikus daitekeenez, BZMMT bionanokonposite hibridoen hezetasun-edukia MMT portzentaia handitzean murrizten da. Bestalde, BZMMT bionanokonpositeek BZ puruarekin aldeduz, unitate glikosidikoen deskonposizioari dagokionean egonkortasun termiko hobea aurkezten dute. Hasierako degradazio tenperatura (T_0) %5-eko masa galerari dagokiona, unitate glikosidikoen deskonposizioarekin erlazionaturikoa, MMT edukiarekin handitzen da. Beste autore batzuek ondorioztatu bezala, MMT-aren presentziak, zelulosa degradazio prozesu termikoetatik babes dezake (Ul-Islam et al., 2012b). MMT nanobuztinek, beroarekiko hesi bailitzan jokatzen dute, bero difusioaren eta gainazaleko masa transferentzia (degradaturiko lurrunkorren

kanpo-migrazioa) oztopatuz, deskonposizio abiadura motelduz (Ray eta Okamoto, 2003).

(a)



(b)



IV.7. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoen:

a) TGA eta b) DTGA termogramak.

Bestalde, IV.3.1. sekzioan kalkulaturiko filmeen porotasun balioen arabera, eta SEM irudietan ikusi bezala, BZMMT laginen trinkotasuna handiagoa da oinarrizko BZ-rekin konparatzen baldin bada eta honek, laginean zehar gasen difusioa atzera dezake. Gainera, bionanokoposite hibridoetan azaltzen diren hondakin kantitateak, MMT-ak

errautsa (*char*) sortzeko daukan gaitasunarekin erlazionatu daiteke, hau handiagoa izanik MMT kontzentrazioa handitzean. Izan ere, **IV.1. Taulan** aurkeztu diren MMT portzentaiak, azterketa termikoan lortu diren bukaerako errauts kantitatearekin erlaziona daitezke giro oxidatzailean burututako saiakuntzetan, BZ-ren errauts kantitatea %0 baita eta bionanokonpositeetan, %7, 11 eta 14 izanik, BZMMT7, BZMMT9 eta BZMMT13 bionanokonpositeentzat, hurrenez hurren. Emaidza hauek bat datoz, *LA-ICP-MS* teknikaren bidez lorturiko emaitzekin, non geroz eta MMT kontzentrazio handiagoko dispersioa gehitu hartidura-ingurunera, orduan eta bukaerako bionanokonpositeetan MMT kantitatea handiagoa lortzen den.

IV.6.Taula. BZ puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren hezetasun-edukia, hasierako depolimerizazio tenperatura eta maximoa (T_{01} eta T_{max1}), unitate glikosidikoaren hasierako eta deskonposizio maximo tenperaturak (T_{02} eta T_{max2}) eta errauts portzentaia 800 °C-tan.

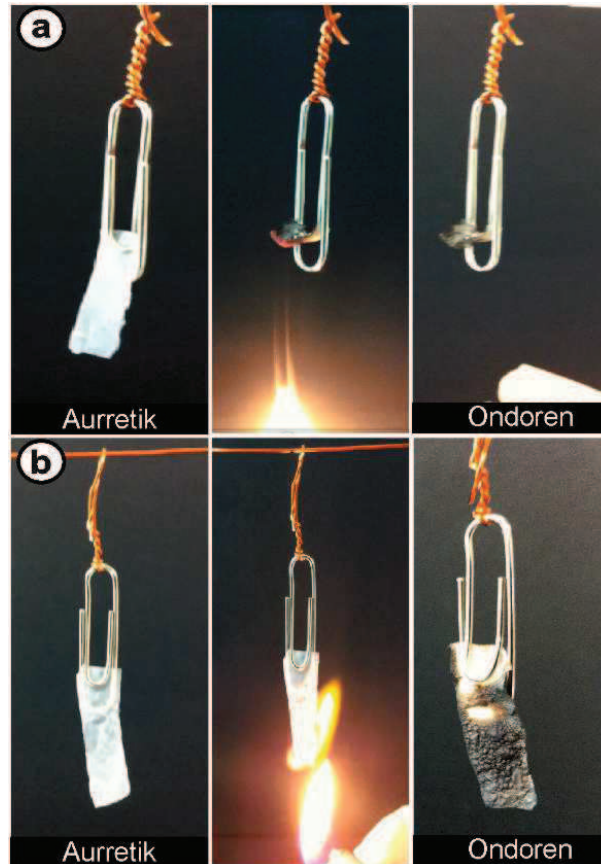
Sistema	Hezetasuna (%)	Tenperatura (°C)				Errautsa (%)
		T_{01}	T_{max1}	T_{02}	T_{max2}	
BZ	4,0	220	317	387	449	0
BZMMT7	3,6	234	305	390	463	7
BZMMT9	1,8	242	298	393	457	11
BZMMT13	1,0	243	303	395	458	14

Sugarrarekiko azterketa

Analisi termikoaz gain, laginek suaren aurrean aurkezten duten erresistentzia aztertu da. Materialenugar-erresistentzia neurtzea garrantzitsua da hainbat aplikazioetarako. BZ purua eta BZMMT bionanokonposite hibridoak suarekin (txinpart batek eraginda) kontaktuan jarri ziren suarekiko portaera kualitatiboa aztertu nahian. **IV.8. Irudian**, BZ eta BZMMT9 bionanokonposite hibridoaren sugarrarekiko saiakuntzan bideokameraz lagina nola erretzen den jarraitu zen eta lorturiko irudi batzuk azaltzen dira.

Ikus daitekeenez, BZ puruan errektuntza ia guztiz gertatzen da (**IV.8a. Irudia**). Bionanokonpositean berriz (**IV.8b. Irudia**), segundo batzuk igarota, sua itzali egiten da laginaren egitura saiakuntza ondoren mantentzen delarik, eta azterketa termograbitrikoaren emaitzekin bat hondakin solidoa antzeman daitekeelarik. Analisi

termograbitmetrikoan edo suarekiko portaeran, SEM mikrografietan ikusi bezala, MMT nanobuztin xaflak BZ-ren egitura barneratuak daudela iradokitzen dute.

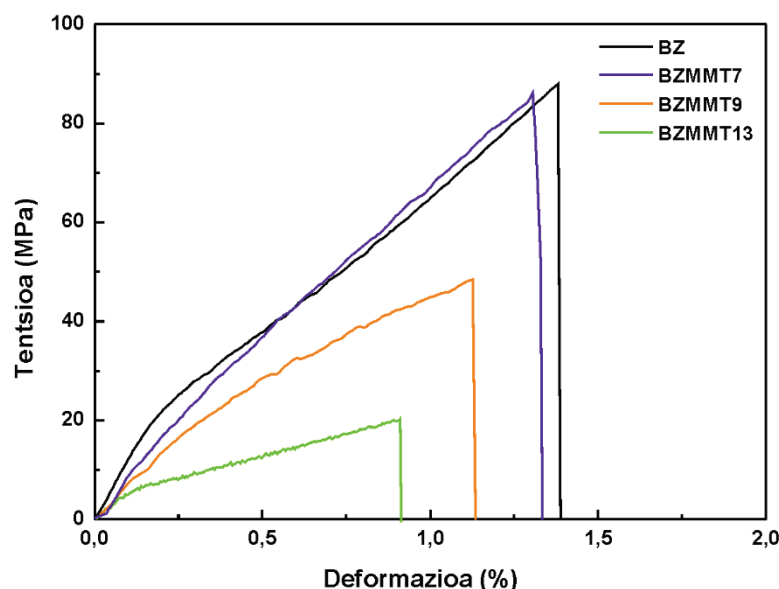


IV.8. Irudia. Sugarrarekiko erresistentzia saiakuntzaren aurretik, bitartean eta ondorengo irudiak:
a) BZ purua eta b) BZMMT9 bionanokonposite hibridoa.

IV.3.4. Portaera mekanikoa

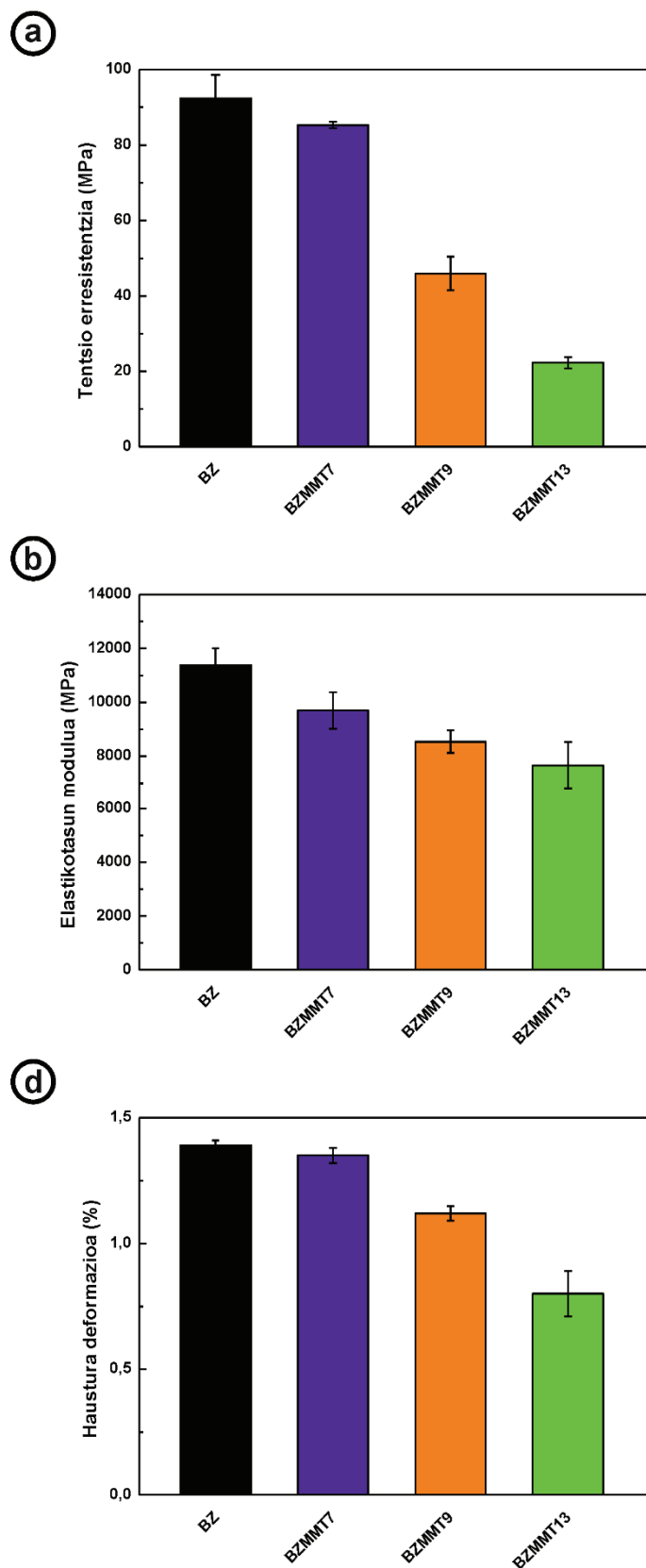
Aurretik aipatu bezala (I. atalean), BZ-ak aurkezten dituen propietate mekaniko paregaberen ondorioz, indartzaile gisa hainbat matrizeetan erabili izan ohi da (Li et al., 2011). BZ-ak, MMT gehikuntzarekin biosintesian izandako egitura aldaketak, BZMMT-ren propietate mekanikoetan eragina izan dezake, aurretik argitaraturiko lanetan aipatzen den bezala (Phisalaphong et al., 2008; UI-Islam et al., 2012b). Hortaz, BZ puruaren eta BZMMT bionanokonpositeen propietate mekanikoak trakzio saiakuntzak burutuz aztertu dira. BZ eta BZMMT laginen tentsio-deformazio kurbak **IV.9. Irudian** azaltzen dira. Kurba guztietan, bi zonalde desberdinu daitezke: lehenengoa, hasierako tentsio balio txikiko eta modulu altuko zonalde lineala, materialaren deformazio elastikoarekin erlazionatua eta bigarren zonalde bat, lineala ere eta modulu txikiagoko zonaldea. Ikus daitekeenez, orokorrean bionanokonpositeen propietate mekanikoak BZ-ren propietateekin aldentuz okertzen dira. Bionanokonposite

guztietan, MMT kantitatea handitzen doan heinean, elastikotasun modulua eta tentsio maximoa txikitzearekin batera haustura deformazioa ere txikitu egiten da, material hauskorragoa bilakatuz.



IV.9. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren tentsio-deformazio kurbak.

BZ eta BZMMT bionanokonpositeen, propietate mekanikoen batzuetan balioak **IV.10. Irudian** aurkezten dira. Emaitzen arabera, bionanokonpositeen tentsio erresistentzia, modulua eta deformazioa BZ-renak baino txikiagoak dira eta MMT kantitatea handitzen den heinean txikitzen dira. Autore batzuek, polimero-nanobutrin konpositeetan lortutako trakzio erresistentzia maximoak BZ puruarekin konparatuz handitzen zirela ikusi zuten (Velmurugan eta Mohan, 2009; Liu et al., 2011). Hala ere, lan honetan BZ puruaren tentsio erresistentzia 92 MPa izanik, 85, 43 eta 23 MPa balioak, baxuagoak, lortu dira, BZMMT7, BZMMT9 eta BZMMT13 bionanokonpositeentzat, hurrenez hurren. Era berean, elastikotasun moduluak oinarriko zelulosarekin alderatuz (11,4 GPa) arinki txikitzen dira, hain zuzen ere, 9,7 GPa-tatik 6,7 GPa-ra MMT edukia %7-tik 13-ra handitzen denean. UI-Islam et al.-ek esaterako, biosintetizatutako BZ lagina (4,2 GPa) kontzentrazio ezberdineko MMT dispersioetan murgiltzean, masan %1, 2 eta 4 MMT edukia duten bionanokonpositeetan, 6,0, 6,1 eta 5,7 GPa-tako moduluak lortu zituzten, hurrenez hurren. Kontzentrazio baxuetan arinki handitzen bada ere, kontzentrazioa handitzean modulua txikitzen zela ikusi zuten (UI-Islam et al., 2012b). Izan ere, UI-Islam et al.-en



IV.10. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoen:

a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak.

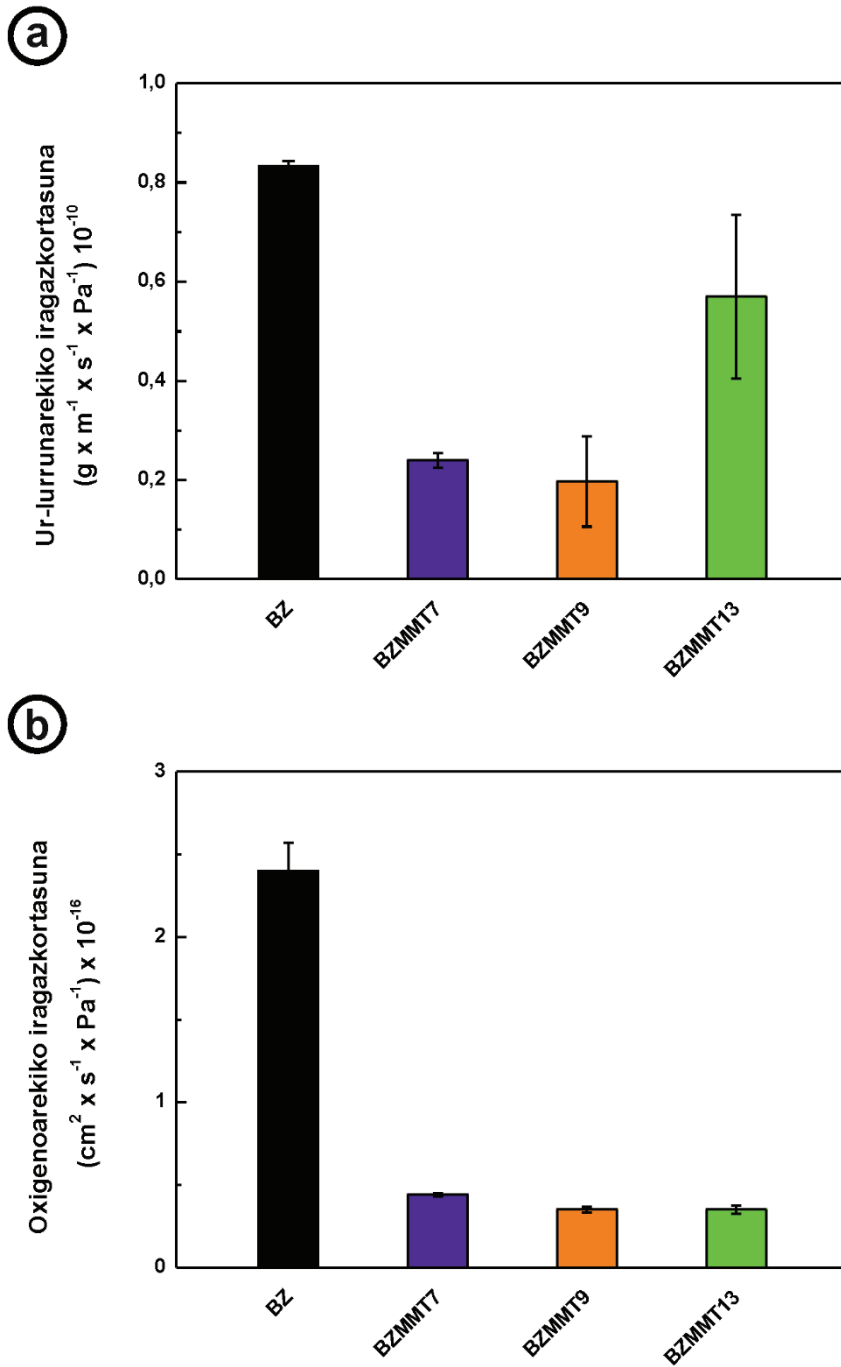
ustetan, zelulosan MMT xaflak dispertsatzean nanozuntzen antolamendua oztopatu dezakete, konpositeen tentsio maximo zein beste propietate mekanikoetan eraginez. Lan honetan aldiz, *in-situ* biosintetizaturiko BZMMT hibridoek, UI-Islam et al.-ek prestaturiko laginek baino modulu altuagoak erakutsi dituzte, MMT eduki handiagoarekin erlazionatu daitekeelarik.

Haustura deformazioari dagokionez, BZMMT bionanokonpositeetan BZ puruarekiko (%1,39) alderatuz, txikitzen dela ikusi da, %1,34, 1,14 eta 0,8 izanik BZMMT7, BZMMT9 eta BZMMT13 bionanokonpositeentzako, hurrenez hurren. Hortaz, BZ puruarekin aldentuz, BZMMT bionanokonpositeen propietate mekanikoak ez direla hobetzen esan daiteke. Darder et al.-en arabera, MMT nanobuztinak hiru dimentsioko BZ sarean hidrogeno zubien bidez eransten dira, zelulosa nanozuntzak indartuz (Darder et al., 2003), baina kasu honetan BZ-ren propietateak aldatzen dira eta hori dela eta propietate mekanikoak. Hauen ustetan, propietate mekanikoen hobekuntza, kontzentrazio baxuetan matrizean tartekaturiko nanobuztin xaflen dispertsio uniformeetan datza, nanobuztinen gainazalaren eta matrize polimerikoaren arteko elkarrekintzak handituz hidrogeno zubien sorkuntzarekin. Baina, lan honetan, lorturiko *FTIR-ATR* emaitzetan ez da BZ eta MMT artean elkarrekintzarik ikusi, eta baliteke propietate mekanikoetan hobekuntzarik ez ikustearen arrazoia izatea. BZMMT13 hibridoan *XRD*-z MMT dispertsio ona egitura interkalatu/esfoliatu batekin lortu den arren, BZ-ren kristaltasun indizean txikitze bat pairatu da (**IV.6. Taula**) eta beste hibridoekiko konparatuz, batez ere BZMMT7-rekiko (**IV.6. Taula**) propietate mekanikoak okerragoak izan dira. Beraz, kristaltasun indizearen jaitsierak ere propietate mekanikoetan hobekuntzarik ez ematea arrazoitu dezake.

IV.3.5. Iragazkortasun azterketa

BZ mintzen aplikazio potentzialetariko bat, *packaging* edo ontziratzea izan daiteke eta horretarako, oso garrantzitsua da ur-lurrin eta oxigeno gasaren iragazkortasunaren murrizketa lortzea. Honela, MMT nanobuztinen gehikuntzak BZMMT bionanokonposite hibridoaren iragazkortasun propietateengan izan dezaketen eragina aztertu da. Lorturiko emaitzak, **IV.11. Irudian** aurkezten dira. Ikus daitekeenez, ur-lurrinaren kasuan, MMT-aren presentziak filmeen iragazkortasuna %70-ean baino gehiago murrizten du, MMT edukia %7 eta 9 denean. *ULI* balioari dagokionean, BZMMT13 bionanokonpositeak BZ matrizeak baino txikiagoa erakusten badu ere, BZMMT7 eta BZMMT9 bionanokonpositeak baino dezente handiagoa erakusten du, non *XRD*-z neurtu den KI^{XRD} balio txikiagoarekin erlaziona daitekeen.

Oxigenoarekiko iragazkortasuna, ontziratze gisa erabiltzeko funtsezko parametroa bilakatzen da, oxigenoak oxidazioa eragiten baitu.



IV.11. Irudia. Sintetizaturiko BZ puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoen:

a) Ur-lurrinarekiko eta b) Oxigenoarekiko iragazkortasunak.

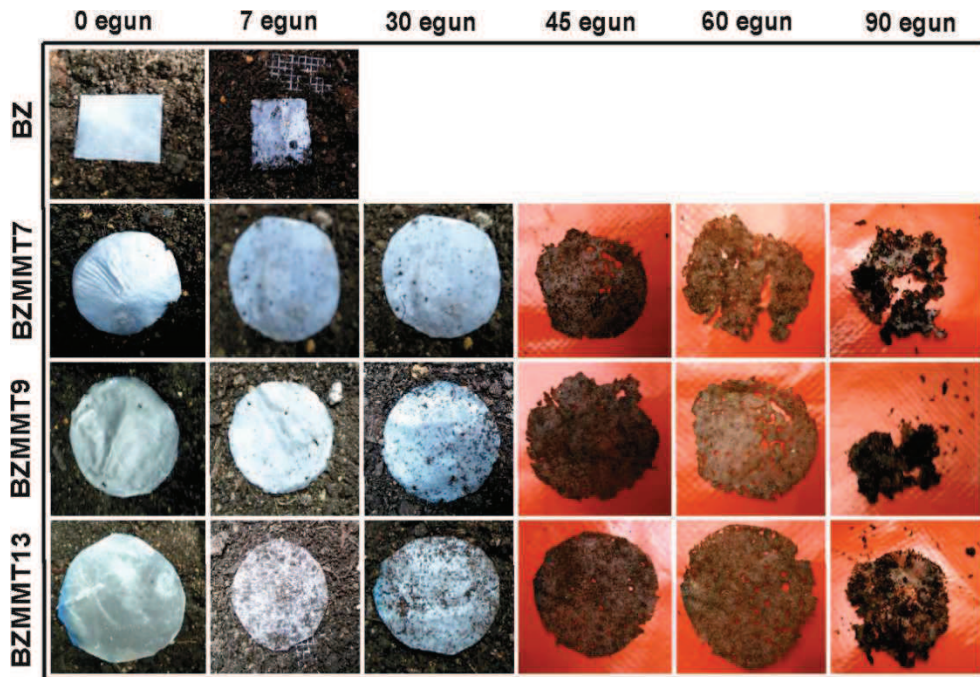
Kasu honetan, *OI* emaitzak azterturik, ur-lurrunarekin loturiko joera bera antzeman daiteke. MMT-aren gehikuntzak BZ-arekin aldeduz, *OI*-an beherakada nabarmen bat eragiten du, beherakada %80-koa baino handiagoa izanik BZMMT bionanokonpositeetan. *ULI* eta *OI* balioen beherakada, nanokargen eraginez eraturiko

bide bihurgunetsuekin erlazonaturik dago, nanokonpositean zehar gas difusioa oztopatuz. Orokorrean, bihurguneak, nanobuztinen gehikuntza medio, iragazkortasun propietate hobeak lortzeko lehen mekanismoa izan da, baina kasu honetan beste faktore batzuk ere kontutan edukitzea beharrezkoa da. Aurretik aipatu bezala, MMT nanobuztinen izaera hidrofilikuari esker BZ mintz hibridoan UAG balioa handitzen da. Gainera, atal honetan aipatu moduan, MMT-ak BZ-ren biosintesia eraldatzen du eta ondorioz, BZ nanozuntzek eratzen duten 3D-ko egituran aurkitzen den bolumen librea eta porotasuna txikituz. MMT nanobuztinen interkalazio/esfoliazioari esker sorturiko bide bihurgunetsuek, UAG-ren handitzea eta porotasun jaitsiera dakarte eta beraz, ur-lurrun eta oxigeno molekula BZMMT filmean harrapaturik gera daitezke. XRD difraktogrametan eta SEM irudietan ikusi bezala, *in-situ* teknikarekin BZ matrizean MMT-aren dispersioa hobesten da eta honek iragazkortasunaren jaitsiera dakar. Yeh et. al.-ek, esaterako, poli(metil metrilato)-aren (PMMA) *in-situ* polimerizazioan MMT nanobuztinen presentziari esker lorturiko nanokonpositeetan MMT-aren esfoliazio hobeagoa lortu zuten eta oxigenoarekiko eta ur-lurrunarekiko iragazkortasun propietatetan hobekuntza antzeman zuten soluzio-dispersio bidez lorturiko PMMA/MMT nanokonpositeekin aldentuz (Yeh et al., 2004). Era berean, Aulin et al.-ek, erabat esfoliatuak bermikulita nanobuztina (masan %10 eta 20-ko kontzentrazioa) nanofibrilaturiko zelulosa matrizean era homogeenan banaturiko biohibridoak prestatu zituzten eta %50-eko hezetasun erlatiboan, gutxi gorabehera OI-aren %75-80 eta ULI-aren %71-78 bitarteko balioen murrizketak lortu zituzten, hain zuzen ere, eta ondorioz, egitura zeharo esfoliatuak diren nanoegiturek sorturiko bide bihurgunetsuen garrantzia azpimarratzen zuten (Aulin et al., 2012).

IV.3.7. Biodegradagarritasun azterketa

Azken urteetan, polimeroen biodegradagarritasunaren ebaluaketan, hainbat arau eta metodo garatu badira ere, II. atalean aipatu bezala, gehienetan biodegradagarritasuna frogatzeko, konpostatze saiakuntza baldintza oso konkretuetan burutu behar izaten da (Singh et al., 2003). Atal honetan erabilitako BZ jatorri berriztagarritik eratorritako materiala izanik, bukaerako bionanokonpositeen biodegradagarritasuna bermatzeak, material hauek hainbat aplikazioetan erabiltzera bultzatzen du. Hori dela eta, BZ eta BZMMT bionanokonpositeak lurpean murgilduz saiakuntzak burutu dira (**IV.12. Irudia**), material hauen itxura aldaketa aztertu da biodegradazioaren ideia kualitatibo bat izatearren. Bibliografiaren arabera, degradazioa bi etapetan ematen da. Lehenengoan, degradazio hidrolitiko gertatzen da, polimeroan zehar hedatzen den uraren difusioa dela eta. Bigarren etapan, degradazio enzimatikoa

gertatzen da, hau da, pisu molekularra murrizten da eta zati oligomerikoak sortzen dira. Ondoren, zatitxo hauek mikroorganismo ezberdinek onartu ditzakete, besteak beste onddoek eta bakterioek (Armentano et al., 2013). Esan beharra dago, material bakoitzak degradazioari aurre egiteko duen gaitasuna propietate fisiko-kimikoekin, hots, polimerizazio-maila eta kristaltasun indizearekin erlazonaturik dagoela, besteak beste. Gainera, aurretik argitaratua izan denez, zonalde kristalinoen degradazioa zailagoa da (Alvarez et al., 2006).



IV.12. Irudia. Denbora ezberdinetan BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren itxura aldaketa biodegradagarritasun saiakuntzan zehar.

IV.12. Irudian, BZ eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren itxura aldaketa erakusten da. Lehen hilabetean BZ lagina guztiz degradatzen bada ere (ezin izan zen lagina errekuperatu), BZMMT laginetan ez da itxura aldaketa nabarmenik ikusten. Bionanokonpositeek kristaltasun indize baxuagoak aurkitzen dituzten arren, degradazio prozesua beranduago jasaten dute eta baliteke, trinkotasunagatik izatea. Ikus daitezenez, lehen 30 egunetan ez da gainazalean aldaketa nabarmenik eman opakotasuna handitu dela izan ezik. Baina, 45. egunean bionanokonposite hibridoaren gainazalean eraldaketa txiki bat gertatzen da eta pitzadura eta zulotxo txiki batzuk antzeman daitezke. 90 egunean, degradazioa nabarmenagoa da, lagina guztiz zatikatua aurkitzen da eta hortik aurrera ez zen denbora luzeagoko laginik lortzerik izan.

IV.4. ONDORIOAK

Lan honetan, MMT eduki altua duten BZMMT bionanokonposite hibridoak prestatu dira *in-situ* teknikaren bidez. BZ biosintesian MMT nanobuztinaren gehikuntza, masa espektrometro eta azterketa termograbitimetroaren bitartez baieztatu da, masan %7, 9 eta 13 MMT edukia duten bionanokonposite hibridoak lortuz. *FTIR-ATR* espektroetan, BZMMT bionanokonposite hibridoak eratu direla konprobatu da, nahiz eta BZ eta MMT artean interakziorik ez den baieztatu. Hala ere, hartidura-ingurunean MMT nanobuztinak gehitzean, zelulosaren biosintesian eragina duela ikusi da. Bukaeran lorturiko BZMMT mintzen etekina arinki murriztu da. Emaitzek, egitura konpaktuagoak lortzen direla iradokitzen dute porotasun baxuagoak lortuz, eta *SEM* teknikarekin bat etorritik, non bionanokonpositeen egitura trinkoa antzeman den. Honez gain, MMT presentziaren ondorioz, *ULI* eta *OI* balioak nabarmenki jaisten dira, portaera honen arrazoa BZ-ren egituraren zehar MMT nanobuztinaren dispersio interkalatua/esfoliatua, *XRD* bidez egiaztatua, izan daiteke, zeinetan bihurturik izateaz gain, ur-lurrun eta oxigeno molekulak harrapaturik geratzen diren. Horregatik, BZ puruarekin konparatuz, opakotasunaren handitzea oso agerikoa ez bada MMT-rekin handitzen da eta ur-atxikipen handiagoa aurkezten dute, BZ eta MMT nanobuztinaren izaera hidrofilikorekin erlazionaturik. Azterketa termikoari dagokionez, MMT nanokargen gehikuntzarekin egonkortasun termikoa handitzen da, bionanokonpositeen trinkotasun handiagoak laginen zehar gasen difusioa atzera dezake. Era berean, sugarrarekiko azterketan, BZMMT9 bionanokonpositeak BZ puruak baino erraus kantitate handiagoa erakutsi du. Propietate mekanikoen emaitzak kontuan hartuz, ez da hobekuntza nabarmenik lortu, eta baliteke bi osagaien arteko interakzio eza arrazoa izatea eta baita kristaltasun indizearen jaitsierak eraginda ere. Gainera, bai BZ zein BZMMT bionanokonpositeak lurpean murgildurik biodegradagarriak direla konprobatu da eta BZ-rekin ez bezala, MMT-arekin indarturiko bionanokonpositeetan degradazio prozesua atzeratzen da. Atal honetan, BZMMT bionanokonposite hibridoak etapa bakarrean lortu dira, eta horren ondorioz, teknika hau interesgarria izan daiteke ontziratze gisako aplikazio potentzial eran, iragazkortasun propietate hobetuak dituzten BZ-n oinarritutako bionanokonpositeak lortzeko. Esan beharra dago, bionanokonposite hibrido guztien artean, propietate konbinaketa hobekien aurkeztu dituen BZMMT9 izan dela, eta ondorengo atalean indarturiko nanokonpositeak prestatzeko aukeratu delarik.

IV.5. BIBLIOGRAFIA

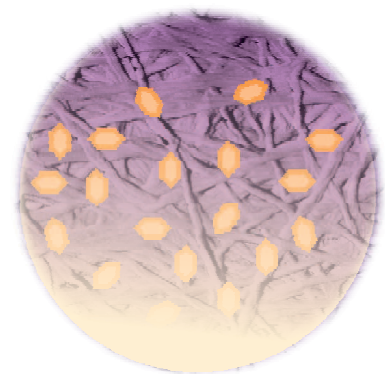
Alemdar, A., Güngör, N., Ece, Ö. I. Atıcı, O. (2005). *The rheological properties and characterization of bentonite dispersions in the presence of non-ionic polymer PEG*. Journal of Materials Science Letters, 40, 171-177.

- Alexandre, M., Dubois, P. (2000). *Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials*. Material Science Engineering: R.: Report, 28, 1-63.
- Alvarez, V. A., Ruseckaite, R. A., Vazquez, A. (2006). *Degradation of sisal/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil*. Polymer Degradation and Stability, 91, 3156-3162.
- Armentano, I., Bitinis, N., Fortunati, E., Mattioli, S., Rescignano, N., Verdejo, R., Lopez-Manchado, M. A., Kenny, J. M. (2013). *Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering*. Progress in Polymer Science, 38, 1720-1747.
- Aulin, C., Salazar-Alvarez, G., Lindström, T. (2012). *High strength, flexible and transparent nanofibrillated cellulose-nanoclay biohybrid films with tunable oxygen and water vapor permeability*. Nanoscale, 4, 6622-6628.
- Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, R. M., White, A. R., Cooper, K. M. (1980). *Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in Acetobacter xylinum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 6678-6682.
- Borosysiak, S., Garbarczyk, J. (2003). *Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibres after mercerisation*. Fibres and Textiles in Eastern Europe, 11, 960-965.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., Demirci, A. (2009). *Effect of different additives on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum and analysis of material property*. Cellulose, 16, 1033-1045.
- Darder, M., Colilla, M., Ruiz-Hitzky, E. (2003). *Biopolymer-clay nanocomposite based on chitosan intercalated in montmorillonite*. Chemistry of Materials, 15, 3774-3780.
- George, J., Ramana, K. V., Siddaramaiah, A. S. B. (2011). *Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites*. International Journal of Biological Macromolecules, 48, 50-57.
- Günister, E., Pestreli, D., Ünlü, C. H., Atici, O., Güngör, N. (2007). *Synthesis and characterization of chitosan-MMT biocomposite systems*. Carbohydrate Polymers, 67, 358-365.
- Huang, H. C., Chen, L. C., Lin, S. B., Hsu, C. P., Cheng, H. H. (2010). *In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation*. Bioresource Technology, 101, 6084-6091.
- Jin, H., Zha, C., Gu, L. (2007). *Direct dissolution of cellulose in NaOH/thiourea/urea aqueous solution*. Carbohydrate Research, 342, 851-858.
- Kataoka, Y., Kondo, Y. (1998). *FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation*. Macromolecules, 31, 760-764.
- Li, S. Y., Srivastava, R. S., Steven, L., Li, Y., Parnas, R. S. (2011). *Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control*. Bioresource Technology, 102, 4241-4250.
- Liu, A., Walther, A., Ikkala, O., Belova, L., Berglund, L. A. (2011). *Clay nanopaper with tough cellulose nanofiber matrix for fire retardancy and gas barrier functions*. Biomacromolecules, 12, 633-641.
- Liu, A., Berglund, L. A. (2012). *Clay nanopaper composites of nacre-like structure based on montmorillonite and cellulose nanofibers-improvements due to chitosan addition*. Carbohydrate Polymers, 87, 53-60.
- Madejová, J., Komadel, P. (2001). *Baseline studies of the clay minerals society source clays: infrared methods*. Clays and Clay Minerals, 49, 410-432.
- Nelson, M. L., O'Connor, R. T. (1964). *Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in cellulose I and II*. Journal of Applied Polymer Science, 8, 1325-1341.
- Ouajai, S., Shanks, R. A. (2005). *Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments*. Polymer Degradation and Stability, 89, 327-335.

- Phisalaphong, M., Suwanmajo, T., Sangtherapitikul, P. (2008). *Novel nanoporous membranes from regenerated bacterial cellulose*. Journal of Applied Polymer Science, 107, 292-299.
- Ray, S., Okamoto, M. (2003). *Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing*. Progress in Polymers Science, 28, 1539-1641.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Zuluaga, R., Castro, C., Gañan, P., de la Caba, K., Mondragon, I. (2010). *Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationship*. Cellulose, 17, 661-669.
- Ruka, D. R., George P. S., Katherine M. D. (2013). *In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate*. Carbohydrate Polymers, 92, 1717-1723.
- Russell, J., Fraser, A. (1994). In Book: Clay mineralogy: spectroscopic and chemical determinative methods. Ed.: Wilson, M. J. FRSE, Springer Netherlands. *Chapter 2: Infrared methods*, 11-67.
- Singh, R. P., Pandey, J. K., Rutot, D., Degée, P., Dubois, P. (2003). *Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: the effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer*. Carbohydrate Research, 338, 1759-1769.
- Slavutsky, A. M., Bertuzzi, M. A., Armada, M., Garcia, M. G., Ochoa, N. A. (2014). *Preparation and characterization of montmorillonite/brea gum nanocomposites films*. Food Hydrocolloids, 35, 270-278.
- Tunç, S., Duman, O. (2010). *Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films*. Applied Clay Science, 48, 414-424.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012a). *Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification*. Carbohydrate Polymers, 88, 596-603.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012b). *Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, 89, 189-1197.
- Velmurugan, R., Mohan, T. P. (2009). *Epoxy-clay nanocomposites and hybrids: synthesis and characterization*. Journal of Reinforced Plastics and Composites, 28, 17-37.
- Wang, S. F., Shen, L., Tong, Y. J., Chen, L., Phang, I. Y., Lim, P. Q., Liu, T. X. (2005). *Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization*. Polymer Degradation and Stability, 90, 123-131.
- Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. (1996). *In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I_{α} and I_{β} at the early stage of incubation*. Cellulose, 3, 229-242.
- Yan, Z., Chen, S., Wang, H., Wang, B., Wang, C., Jiang, J. (2008). *Cellulose synthesized by Acetobacter xylinum in the presence of multi-walled carbon nanotubes*. Carbohydrate Research, 343, 73-80.
- Yeh, J. M., Liou, S. J., Lai, M. C., Chang, Y. W., Huang, C. Y., Chen, C. P., Jaw, J. H., Tsai, T. Y., Yu, Y. H. (2004). *Comparative studies of the properties of poly(methyl methacrylate)-clay nanocomposite materials prepared by in situ emulsion polymerization and solution dispersion*. Journal of Applied Polymer Science, 94, 1936-1946.

V. Atala

BAKTERIO-ZELULOSA, MONTMORILLONITA ETA ALMIDOI TERMOPLASTIKOZKO BIONANOKONPOSITEAK



V. BAKTERIO-ZELULOSA, MONTMORILLONITA ETA ALMIDOI TERMOPLASTIKOZKO BIONANOKONPOSITEAK

V.1. HELBURUA

Atal honetako helburu nagusia, bakterio-zelulosa, montmorillonita eta almidoi termoplastikozko eduki ezberdinak dituzten *ex-situ* edo inpregnazio teknika erabilia, bionanokonpositeak prestatzea da. Lehenik eta behin, almidoiaren gelatinizazio baldintzak finkatu dira. Bionanokonpositeen prestakuntzarako, III. atalean ez-ohiko hondakinetatik eta baldintza estatikoan biosintetizaturiko BZ mintza, eta IV. atalean nanobuztinez indarturiko BZMMT mintz hibridoa erabili dira. Azken honetarako, IV. atalean karakterizazio ezberdinak burutu ondoren, propietate interesgarrienak aurkeztu dituen BZMMT9 mintz hibridoa aukeratu da. Hortaz, atal honen helburua propietate mekaniko eta iragazkortasun propietate hobetuak dituzten bionanokonposite gardenak prestatzea da. Horretarako, inpregnazioz prestatutako bionanokonpositeen karakterizazio fisiko-kimikoa, mekanikoa, mekaniko-dinamikoa, termikoa eta morfologikoa burutu dira. Horietaz gain, ur-lurrunarekiko eta oxigenoarekiko iragazkortasuna eta biodegradagarritasuna aztertu dira.

V.2. PROZEDURA ESPERIMENTALA

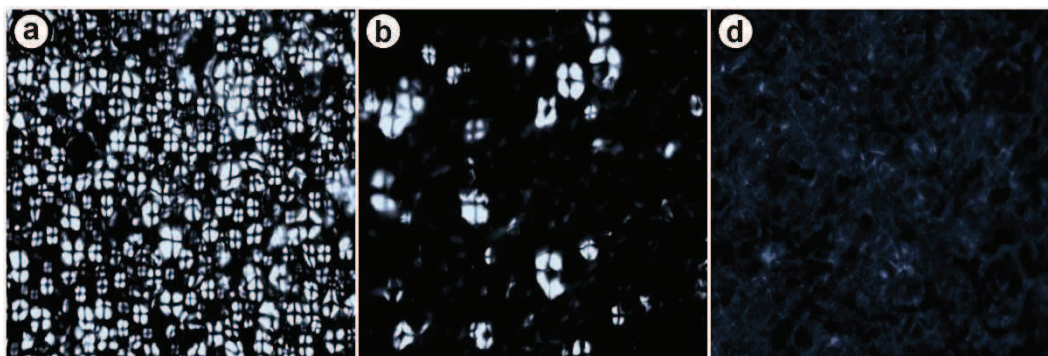
V.2.1. Almidoi termoplastikozko matrizearen prestakuntza

II. Atalean esan denez, matrize bezala arto-almidoian oinarrituriko polimero naturala erabili da, zeina bi polisakarido ezberdinek osatzen duten, amilosak eta amilopektinak, masan %73 eta 27 izanik, hurrenez hurren. Almidoi termoplastikoa (ATP) sortzeko, tratamendu termikoen bidez almidoiaren granulu egitura desegin behar da (Van Soest et al., 1996). Tratamendu termiko hauetan, hainbat prozesu fisiko eta kimiko ematen dira, esaterako: uraren difusioa, granuluen puztea, gelatinizazioa, deskonposizioa, fusioa eta kristaltzea. Hauen artean, gelatinizazioa da prozesu garrantzitsuenetakoa, almidoiaren eraldaketa bertan oinarritzen baita. ATP lortze prozesuan plastifikatzaile bat erabiltzea ere ezinbestekoa da (ura, glizerola, sorbitola, etab.), beti ere tenperatura altua eta ebakidura indarrak erabiliz (Wang et al., 2003; Vilpoux eta Avèrous, 2004).

Lan honetan, almidoiaren gelatinizazioa glizerola-ura plastifikatzaile gisa erabiliz burutu da. Horretarako, lehenik eta behin 3,58 g almidoi 35 mL ur desionizatuan disolbatu dira disoluzio homoginoa lortu arte eta ondoren disoluzio hau 90 °C-tan dagoen olio bainu batetan berotu da. Jarraian, xiringarekin 1,93 g glizerol gehitzen dira

eta etengabeko agitazio magnetikoarekin ($300 \text{ bira} \times \text{min}^{-1}$ -ko) 20 minututan nahastu da, almidoiaren gelatinizazioa gertatu arte. Erabilitako almidoi-glizerol erlazioa, %35 glizerol almidoiarekiko izan da.

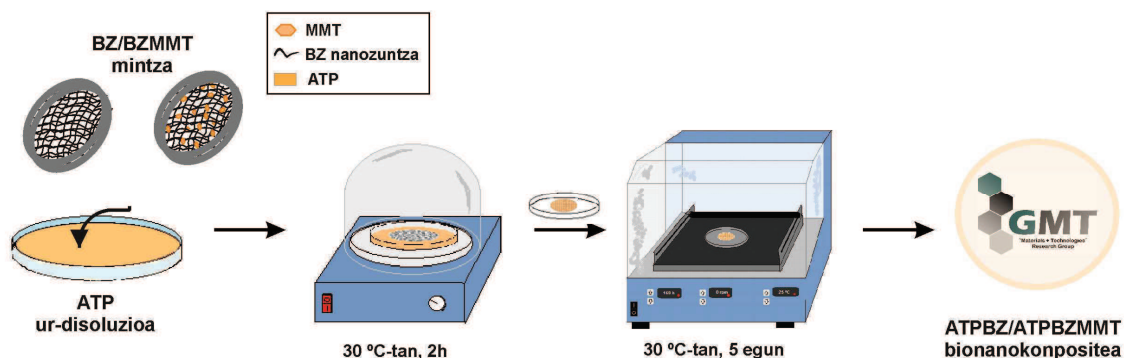
Gelatinizazio prozesua modu egokian burutu dela ziurtatzeko, argi polarizatua duen mikroskopia optikoa (MO) erabili da, denbora ezberdinetan nahasketatik hartu den lagina aztertuz. Lorturiko mikrografiak **V.1. Irudian** aurkezten dira. Hasieran (**V.1a. Irudia**), almidoiak Malta-gurutze egitura duten guneak aurkezten ditu eta hau, almidoiaren izaera erdi-kristalinoaren seinale da, zeintzuek birrefringenteak diren. Gelatinizazio prozesua aurrera doan heinean, almidoiaren berezko egitura erdi-kristalinoa desagertzen doa Malta-gurutzeko egitura kopurua gutxituz (**V.1b. Irudia**). Azkenik, 20 minuturen buruan, egitura erdi-kristalinoa guztiz desagertzen da, gelatinizazio prozesua eman dela frogatuz (**V.1d. Irudia**).



V.1. Irudia. Almidoi granuluaren gelatinizazio prozesuaren MO irudiak:
a) 0 min, b) 10 min eta d) 20 min.

V.2.2. ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonposite filmen prestakuntza

Almidoi termoplastikoa eta bakterio-zelulosa (ATPBZ) eta almidoi termoplastiko eta bakterio-zelulosa/montmorillonita (ATPBZMMT) bionanokonpositeak *ex-situ* prestatu dira inpregnazio teknikarekin. Aurretik prestatutako ATP ur destilatuarekin diluituz, kontzentrazio ezberdineko ATP ur-disoluzioak prestatu dira (masan %80, 60 eta 40 ATP). Ondoren, BZ eta BZMMT (masan %9-ko MMT edukia) mintzak ATP ur-disoluzio ezberdinekin inpregnatzen dira. Horretarako, lehendabizi, $2 \times 2 \text{ cm}^2$ -ko hainbat zati trokelatu dira aurretik biosintetizatutako BZ eta BZMMT9 mintzetatik (lehortu gabeak) eta bakoitza almidoi ur-disoluzio ezberdinetan murgildu dira. Inpregnazio prozesua hutsune kanpian 2 orduz $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -tako tenperaturaren burutu da. Inpregnatutako filmak, disoluziotik atera eta $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -tan lehortu dira 5 egunetan giro kontrolatuan. Prozesu honen eskema **V.2. Irudian** azaltzen da.



V.2. Irudia. Bionanokonposite sistema ezberdinen prestakuntzarako jarraituriko protokoloaren eskema.

Halaber, mintz mikroporotsuekin (BZ eta BZMMT9) eta ATP puruaren filmak lortzeko prestakuntza baldintza berak jarraitu dira. Filmeen lodierari dagokionez, bionanokonpositeetan 10-50 μm bitarteko balioak lortu diren bitartean, almidoi filmeetan 50-80 μm artekoak lortu dira. Lortutako bionanokonpositeen BZ zein BZMMT edukia, inpregnazio aurreko eta ondorengo pisu diferentziaz lortu da. Horretarako, lehortze ziklo bera jasan duen lagin beretik hartutako BZ-ren (edo BZMMT9) ur edukia kalkulatu da eta balio hori bionanokonpositeen BZ edo BZMMT9 edukia kalkulatzeko kontutan izan da. ATP edukia, pisu ezberdintasunetik kalkulatu da, BZ zein BZMMT9 puruen eta bukaerako filmen pisuen arteko diferentziaz. BZMMT mintz hibridoaren MMT edukia jakina denez (masan %9), ATPBZMMT bionanokonpositeetan, MMT edukia kalkulatzeko balio hau erabili da. Prestaturiko bionanokonpositeak, ATPBZX eta ATPBZXMMTY bezala izendatu dira, non X zelulosa edukia den eta Y MMT edukia. Prestaturiko laginen konposizioa eta izendapena **V.1. Taulan** aurkezten dira.

Bionanokonpositeen osagaien izaera hidrofilikoa dela eta, laginen karakterizazioa burutu aurretik, hauek 7 egunetan 25 °C eta %43-ko hezetasun erlatiboan mantendu dira, potasio karbonato soluzio ase bat erabiliz.

V.1. Taula. Sintetizaturiko bionanokonposite sistema ezberdinen ATP, BZ eta MMT eduki ezberdinak eta beraien izendapena.

Sistema	ATP ur-disoluzioa (%)	Bionanokonpositeen edukia (%)	
		BZ	MMT
ATP	100	-	-
ATPBZ25	80	25,0 ± 4,0	-
ATPBZ44	60	44,0 ± 3,5	-
ATPBZ68	40	68,0 ± 5,4	-
BZ	-	100,0 ± 0,0	-
ATPBZ25MMT2	80	25,0 ± 3,0	2,0
ATPBZ44MMT4	60	44,0 ± 5,2	4,0
ATPBZ66MMT6	40	66,0 ± 5,1	6,0
BZMMT9	-	91,0 ± 2,8	9,0

V.3. EMAITZAK ETA EZTABAIDAK

V.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa

Gardentasun azterketa

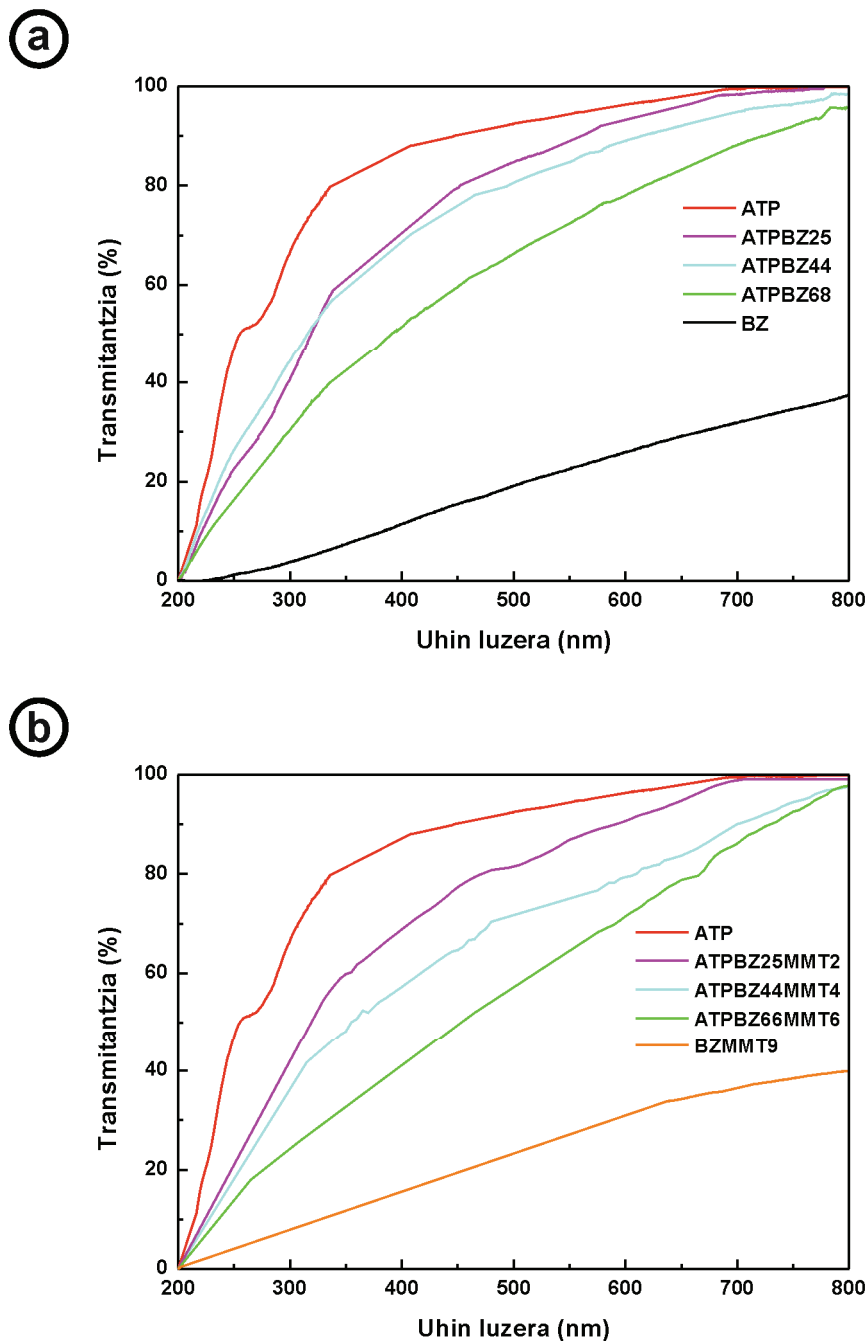
BZ, BZMMT9 eta ATP film puruen eta bionanokonpositeen irudi digitalak **V.3. Irudian** azaltzen dira. Ikus daitekeenez, BZ gardentasun baxuko sistema den arren, ATP-an oinarrituriko bionanokonposite filmek gardentasun handiagoa aurkezten dute; hala ere, beraien artean ezberdintasunak antzeman daitezke.



V.3. Irudia. Osagai puruen eta bionanokonpositeen irudi digitalak:

a) BZ, b) ATPBZ25, d) ATP, e) ATPBZ25MMT2 eta f) BZMMT9.

Beraz, gardentasunaren azterketa kuantitatibo bat burutzearen izpi ultramore-ikuskor espektroskopia teknikaren bitartez laginak analizatu dira. **V.4. Irudian**, film puruen eta bionanokonposite ezberdinen *UV-ikus* espektroak azaltzen dira. **V.4a. Irudian** ikus daitekeenez, BZ-k transmitantzia baxua aurkezten du uhin-luzera tarte osoan. ATPBZ bionanokonpositeek, ATP-aren inpregnazioa dela eta, transmitantzia balio altuagoak aurkezten dituzte.



V.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen transmitantzia uhin-luzerarekiko:

a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistemak.

Zelulosa eduki altuak dituzten laginek ere, transmitantzia altua aurkezten dute, BZ-tik baino ATP puruaren kurbatik hurbilago. Emaiza hauek, bat datoz aurretik argitaratutako lanekin, non BZ portzentaia altuko epoxidatutako soia olio konpositeetan gardentasun maila altua lortu zen, %75 BZ edukiarekin (Retegi et al., 2012). Efektu hau, BZ-ren 3D-ko sare egitura nanoporotsuan zehar polimeroaren distribuzio onarekin erlazionatu izan da (Yano et al., 2005). ATPBZMMT sistemaren kasuan (**V.4b. Irudia**), transmitantzia balio baxuagoak lortu dira beraien ATPBZ homologoekin alderatuz. Beste autore batzuek ere, MMT gehitzean gardentasuna gutxitzen dela ikusi dute. Yu et al.-ek polibinil alkoholari MMT gehitzean eta Tunç eta Osman-ek metilzelulosari MMT gehitzean, besteak beste (Yu et al., 2003; Tunç eta Osman, 2010).

Honez gain, II.2. atalean aurkezturiko II.7. ekuazioarekin izpi ultramore-ikuskor kurbetatik, osagai puruen eta bionanokonpositeen opakotasun balioak kalkulatu dira eta **V.2. Taulan** azaltzen dira.

V.2. Taula. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen opakotasun balioak.

Sistema	OP (u.a. x mm⁻¹)
ATP	0,17 ± 0,01
BZ	4,43 ± 0,06
BZMMT9	5,30 ± 0,04
ATPBZ25	0,68 ± 0,03
ATPBZ25MMT2	2,97 ± 0,20
ATPBZ44	1,35 ± 0,45
ATPBZ44MMT4	3,03 ± 0,02
ATPBZ68	2,29 ± 0,34
ATPBZ66MMT6	3,36 ± 0,09

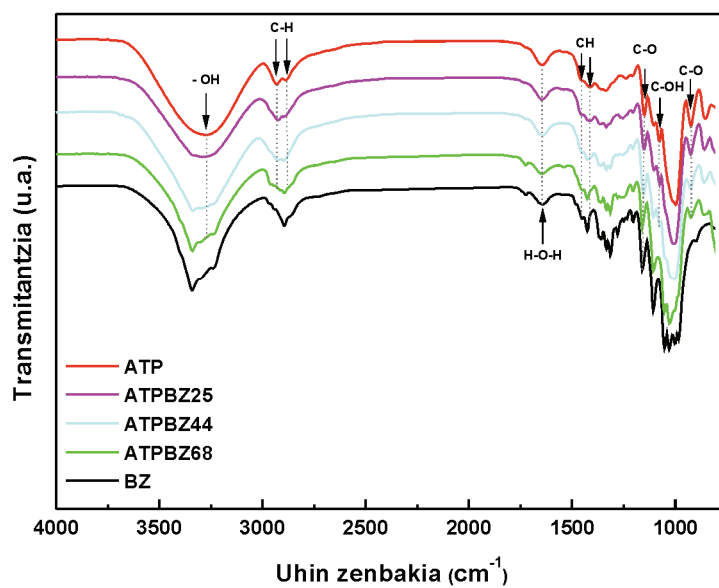
V.2. Taulan ikus daitekeen moduan, opakotasun balioak (*OP*) transmitantzia kurbek aurkezten duten alderantzizko joera erakusten dute, non opakotasuna jaitsiera bat ikusi den ATP edukia handitzean. Gainera, BZMMT9-arekin prestatuturiko bionanokonpositeetan, BZ puruarekin prestatuturikoetan baino *OP* balio arinki handiagoak lortu dira, MMT-ak eragiten duen argi dispersio edo absortzio dela eta.

Egitura kimikoa

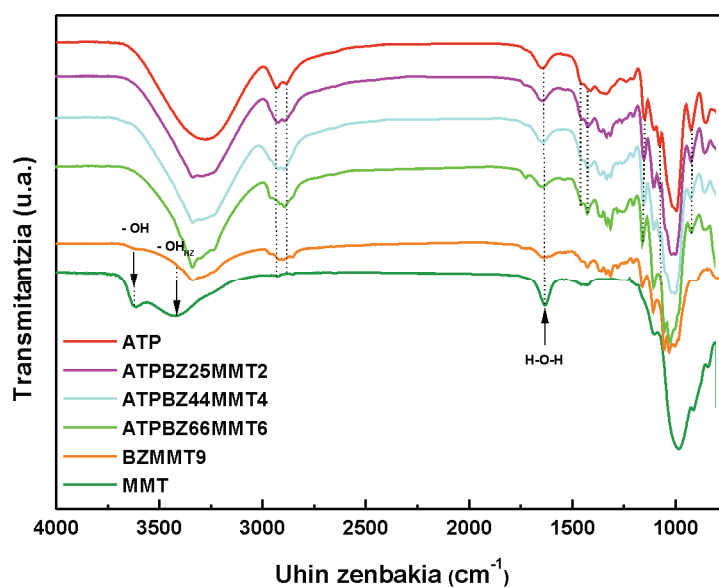
BZ eta ATP puruen eta ATPBZ bionanokonpositeen egitura *ATR-FTIR* teknikaren bitartez aztertu da eta **V.5a. Irudian** lorturiko espektroak aurkezten dira. Izan ere, BZ eta ATP-ak duten antzeko egitura kimikoa dela eta, antzeko espektroak lortu dira osagai puruentzat eta beraien bionanokonpositeentzako. BZ-ren espektroan, aurretik ikusi bezala, zelulosa I egiturari dagokion piku esanguratsuak azaltzen dira (Nelson eta O'Connor, 1964; Yamamoto eta Fumitaka, 1994; Yamamoto et al., 1996; Grande et al., 2009). Horrela O-H tentsio bibrazioa, CH eta CH₂ tentsio eta flexio bibrazioak, C-O eta C-O-C zubi glikosidikoekin erlazionaturiko pikua eta azkenik zelulosaren β loturarekin erlazionaturiko pikua antzeman daitezke. ATP-ari dagokionean, 3278 cm⁻¹ uhin zenbakian, O-H taldearen tentsio bibrazioari dagokion piku zabal bat antzematen da. Horretaz gain, C-H loturari dagokion tentsio bibrazioaren bi piku azaltzen dira 2930 eta 2887 cm⁻¹-ean eta flexio bibrazioekin erlazionaturik daude pikua 1460 eta 1415 cm⁻¹-ean. Honez gain, 1150 eta 1076 cm⁻¹-tan azaltzen diren pikua C-O eta C-OH taldeen tentsio bibrazioekin erlazionaturik daude, hurrenez hurren. Gainera, 924 cm⁻¹-ean almidoiarentzat karakteristikoa den C-O taldearen tentsio bibrazioa agertzen da (Yin et al., 2005; Cyras et al., 2008; Karimi et al., 2014). ATPBZ bionanokonpositeen kasuan, osagai puruen espektro infragorriak antzekoak badira ere, desberdintasun batzuk antzematen dira ATP eta BZ eduki desberdinekin. BZ eduki handietan, ATPBZ66 eta ATPBZ44 bionanokonpositeetan, BZ puruari dagokion bandak nabariagoak dira, aldiz, ATP edukia handia duten bionanokonpositean, ATPBZ25 bionanokonpositean, ATP espektroan esanguratsuak diren pikua gehiago nabarmentzen dira. Azkenik, lagin guztietan, osagaien izaera hidrofilikoa dela eta xurgaturiko urarekin erlazionaturiko pikua 1650 cm⁻¹-tan ikus daiteke.

V.5b. Irudian, ATPBZMMT bionanokonposite hibridoaren eta osagai puruen espektroak aurkezten dira. Aurrez ikusi bezala, BZMMT9 laginaren espektroan BZ eta MMT osagai puruen piku karakteristikokoak ikus daitezke. ATPBZMMT bionanokonpositean, ATPBZ bionanokonpositeetan azaltzen diren antzeko pikua ikus daitezke eta ez dira MMT-ari atxikitutako pikua nabarmentzen, seguraski bionanokonpositeen MMT eduki baxua dela eta. Gainera, ATPBZ bionanokonposite sisteman ikusi den moduan, ATPBZMMT bionanokonpositeen espektroetan xurgatutako urari dagokion pikua antzeman daiteke.

a



b



V.5. Irdia. Sintetizaturiko BZ, ATP eta MMT osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen FTIR-ATR espektroak:

a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

V.3.2. Azterketa termikoa

Analisi termograbitrikoa

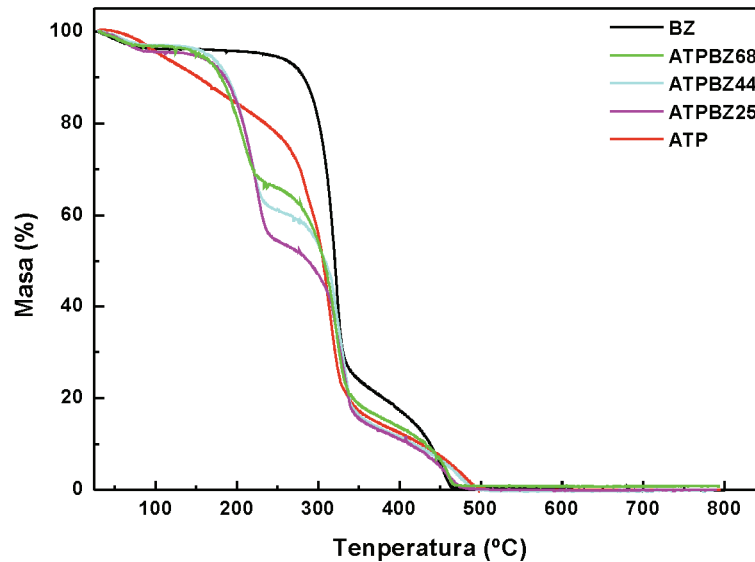
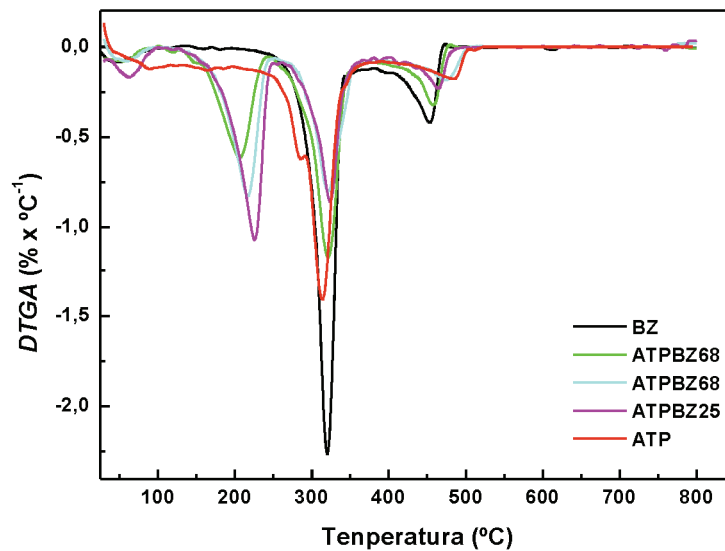
Azterketa termograbitrikoaren bidez, osagai puruen eta prestatuturiko bionanokonposite ezberdinen egonkortasun termikoaren azterketa burutu da. Hala

nola, BZ, ATP, MMT osagai puruen eta BZMMT9 hibridoan eta prestatuturiko bionanokonpositeei, 25-800 °C tenperatura tartean, oxigeno ingurunean buruturiko saiakuntzen *TGA* eta *DTGA* termogramak **V.6.** eta **V.7. Irudietan** azaltzen dira. BZ laginari dagokionez, xurgaturiko ur lurrunketarekin (80-120 °C), depolimerizazioarekin (250-400 °C) eta unitate glikosidikoen deskonposizioarekin (>400 °C) erlazonaturiko masa galera ikus daitezke (Cheng et al., 2012). ATP laginak ere xurgaturiko uraren masa galera aurkezten du 100 °C inguruan. Ondoren, 175-300 °C tartean, glizerolean aberatsa den fasearekin erlazonaturiko masa erorketa jarrai bat antzematen da, aldiz 320°C-tan bapateko masa galera bat ikus daiteke almidoiari dagokiona (Cyras et al., 2006; Martins et al., 2009; García et al., 2011; Karimi et al., 2014). Tenperatura altuagotan ikus daitekeen masa galera, errauts hondakinaren konbustioan sortzen diren gasen ondorioz ematen da (Biagini et al., 2002; Nowicki eta Ledakowicks, 2014).

ATPBZ bionanokonpositeen egonkortasun termikoari dagokionean, zenbait ezberdintasun antzeman daitezke (**V.6. Irudia**). Hasteko, osagai puruetan azaltzen den moduan, kasu honetan ere, ur-lurruntzeari dagokion masa galera azaltzen da 100 °C inguruan. Ikus daitekeenez, masa galera arinki handitzen da BZ edukia txikitzean, joera hau bionanokonpositeak prestatzeko prozesuarekin loturik egon daiteke, non almidoiaren kontzentrazioa aldatzeko ura erabili den aldagai gisa. Jarraian, 200 °C-tan, ATP edukiarekin handitzen den bigarren masa galera ikus daiteke eta gainera galera hau nabarmenagoa da bionanokonpositeetan ATP matrizean baino. Aipatzekoa da masa galera hau, ATP matrizean glizerolean aberatsa den fasearen degradazio tartean ematen dela. Bibliografian aipatu izan da, almidoiaren osagaiek (almidoi-glizerol-ura) zelulosarekiko afinitate desberdina dutela (Anglès eta Dufresne, 2001). Lan honetan, bionanokonpositeak prestatzeko matrizearen konposizioa aldatzeak (ur gehiago gehitzeak) almidoiaren osagaien zelulosarekiko afinitatea aldatu dezake.

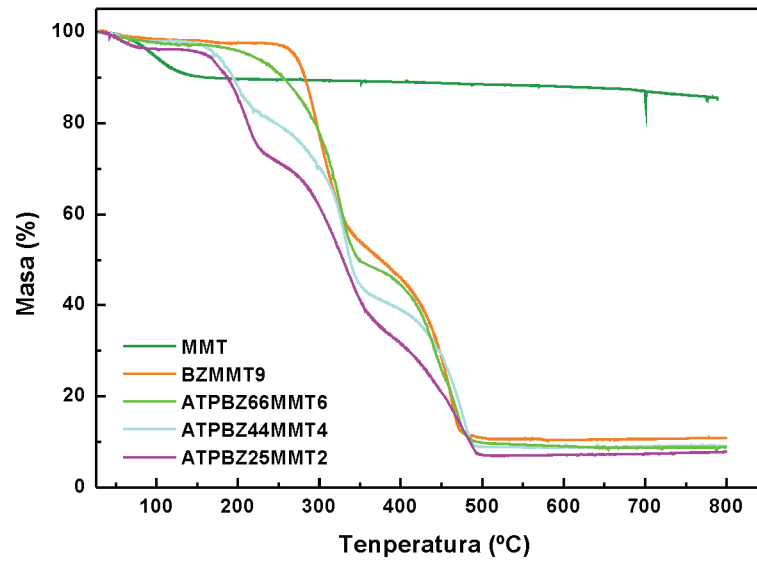
ATPBZMMT sistemari dagokionez, orokorrean ATPBZ sistemarekin aldentuz, egonkortasun termikoa eta errauts edukia handitzen da (**V.7. Irudia**). Honen arrazoia, sistema honetan gehituriko MMT nanobuztin xaflek konbustioarekiko eta degradazio termikoarekiko duten erresistentzia handia da (Ray eta Okamoto, 2003). Kasu honetan, glizerolean aberatsa den fasean gertaturiko masa galera, ez da ATPBZ sisteman bezain nabaria hainbat aldagaiek eragiten dutelarik. Aurretik ikusi denez, BZMMT mintzek, BZ mintzek baino izaera hidrofilikagoa erakutsi dute eta honek eta almidoiaren osagaien (almidoi-glizerol-ura) BZ mintzarekiko afinitatea aldatzen dela iradokitzen dute. Bi sistemen *DTGA* kurbak alderatuz, glizeroletan aberatsa den fasearekin erlazonaturiko pikua ATPBZMMT sisteman txikiagoak dira ATPBZ

sisteman baino eta honek osagaien afinitate desberdintasuna berresten duelarik. Azkenik, esan beharra dago, laginen hondakina BZMMT9 edukiarekin handitzen dela, temperatura altuetan oso egonkorra den MMT edukiarekiko zuzenki proportzionala baita. **V.7. Irudian** ikus daitekeen bezala, 800 °C-tan MMT-ak lagin lehorrearekiko, %90 baino handiagoa den errautsa aurkeztu du.

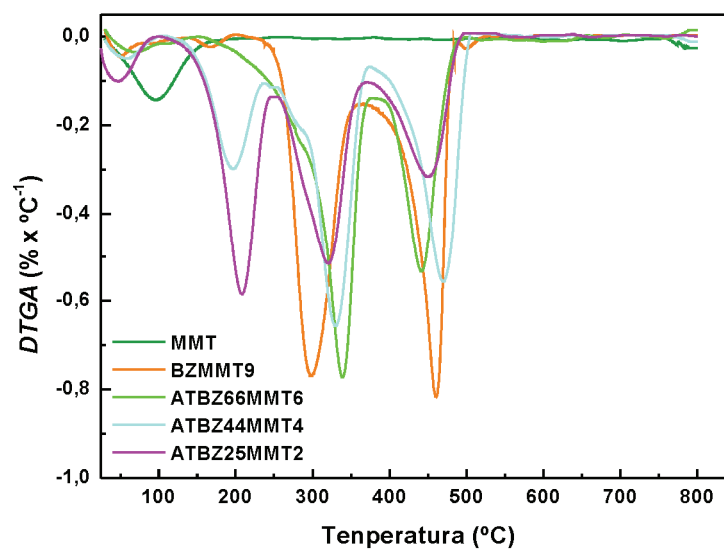
(a)**(b)**

V.6. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen eta ATPBZ bionanokonposite sistema ezberdinen:
a) TGA eta b) DTGA termogramak.

(a)



(b)



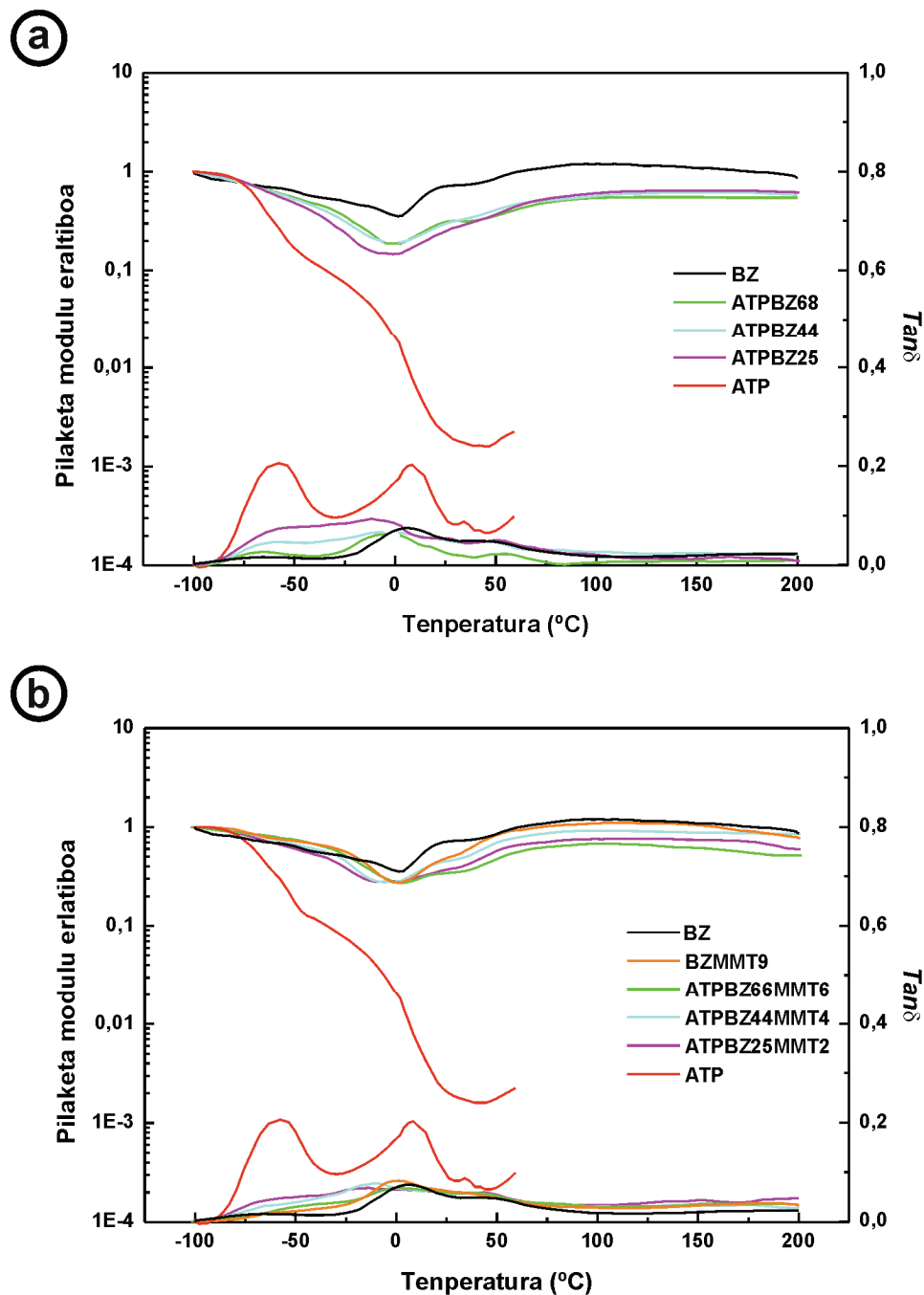
V.7. Irudia. Sintetizaturiko MMT osagai puruaren, BZMMT9 hibridoaren eta ATPBZMMT bionanokonposite sistema ezberdinen:

a) TGA eta b) DTGA termogramak.

Azterketa mekaniko-dinamikoa

ATP eta BZ osagai puruak, BZMMT9 hibridoa eta ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonposite sistemak analisi dinamiko mekanikoaz karakterizatu dira. **V.8. Irudian**, pilaketa modulu erlatiboa (E_R) (neurturiko pilaketa moduluaren eta beira egoeran lorturiko pilaketa moduluaren arteko erlazioaz emana) eta galera-faktorearen

($Tan\delta$) bilakaera temperaturarekiko irudikatu dira. ATP-ak bi erlaxazio prozesu aurkezten ditu, pilaketa modulu erlatiboan ikus daitezkeen jaitzierarekin erlazionatuak, eta aldi berean, $Tan\delta$ kurban agertzen diren pikuen maximoekin bat. Bi erlaxazio



V.8. Irdia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen pilaketa modulu (E_R') eta galera-faktorearen ($Tan\delta$) bilakaera temperaturaren aurrean:

a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

prozesu hauek, ATP-aren beira trantsizioarekin erlazonaturik daude, alde batetik, -75 eta -40 °C bitartean (Tg_1) eta bestetik, -10 eta 25 °C temperatura tartean (Tg_2), hurrenez hurren. Hortaz, ATP-ak sistema heterogeneo baten osaera erakusten du, eta aurretik argitaratu moduan, glizerolean aberatsa den faseak (temperatura baxuetan) eta almidoian aberatsa den faseak edo almidoi-faseak (temperatura altuagotan) osatzen dute (Lourdin et al., 1997; Zeppa et al., 2009; Chivrac et al., 2010). BZ mintz puruarentzat, pilaketa moduluaren erorketa bat ikus daiteke eta aldi berean galera-faktoreen maximo bat azaltzen da -25 eta 25 °C temperatura tartean, plastifikatzaile bezala jokatzeko duen askaturiko urarekin erlazioa daitekeena (Figueiredo et al., 2013).

Era berean, ATPBZ bionanokonpositeetan BZ-ren presentziak, bi faseen (glizeroletan aberatsa eta almidoian aberatsa) erlaxazio tenperaturak balio txikiagotara desplazatzen ditu (**V.8a. Irudia**). Jakina da, bai glizerolak zein urak zelulosarekiko oso afinitate ona erakusten dutela (Angellier et al., 2006). Bestalde, bibliografian ikusi da, urak almidoian aberatsa den fasearen plastifikatzaile bezala jokatzeko duela, Tg_2 trantsizio tenperatura jaitsiaz (Anglès eta Dufresne, 2001). Hau kontutan izanik, prestaturiko ATPBZ bionanokonpositeak ATP matrize puruarekiko alderatuz, glizerol eta ur eduki handiagoa lukete. Honek, bionanokonpositean almidoi termoplastikoa osatzen duten hiru osagaien (almidoi-glizerol-ura) distribuzio desberdina eragingo luke. Hori dela eta, BZ edukia handitzean, glizerolean aberatsa den fasearen trantsizioa, tenperatura baxuetara desplazatzen da. Gainera, uraren plastifikatzaile efektuaren eraginez, almidoian aberatsa den fasearen erlaxazio prozesuan tenperatura txikitze bat gertatzen da hasierako ATP matrizearekin alderatuz. Honetaz gain, bionanokonpositean BZ edukia handitzen den heinean, bi erlaxazio prozesuen magnitudea txikitu egiten da, erlaxatzen diren entitateen edukiaren jaitsierarekin eta BZ-ren eraginez, moduluaren erorketan ematen den txikitzearekin bat.

ATPBZMMT sistemarentzat ere bi erlaxazio prozesu ikusten dira, pilaketa moduluan eta $Tan\delta$ kurbetan (**V.8b. Irudia**). Hala ere, ATPBZ sisteman ez bezala, glizeroletan aberatsa den faseari dagokion erlaxazio prozesua ez da tenperatura txikiagotara desplazatzen. Honez gain, erlaxazio honen magnitudea, aurretik ikusirikoa baino askoz txikiagoa da. IV. atalean, BZ mintzarekin alderatuz, *in-situ* teknikaren bidez sintetizaturiko BZMMT9 mintzaren SEM mikrografietan, MMT nanobuztin xaflak, zelulosa nanozuntzen artean dispertsaturik zeudela ikusi da, egitura trinkoagoa osatuz. Bai MMT nanobuztin xaflen dispertsio homogeneoak eta bai egitura konpaktuagoa izateak, glizerolak, BZ mintzarekin aurretik aurkeztu duenarekin konparatuz, BZMMT9

mintzarekiko erakutsi dezakeen afinitatea aldatzen du. Almidoian aberatsa den erlaxazio prozesuari dagokionez, bionanokonpositeetan BZMMT9 edukia txikitzen den heinean, tenperatura baxuagotan ematen da. Gainera, aurretik ikusi denez (IV.atalean), BZ mintzan nanobuztin hidrofiliakoak txertatzeak, BZMMT9 hibridoaren ur-atxikipen gaitasuna %250-ean handitzen du. Hortaz, BZMMT9 mintzak BZ mintzak baino urarekiko afinitate altuagoa aurkeztuko duenez, uraren plastifikatzaile efektua murrizten da eta almidoian aberatsa den faseari dagokion erlaxazio prozesuaren tenperatura handitzea dakar.

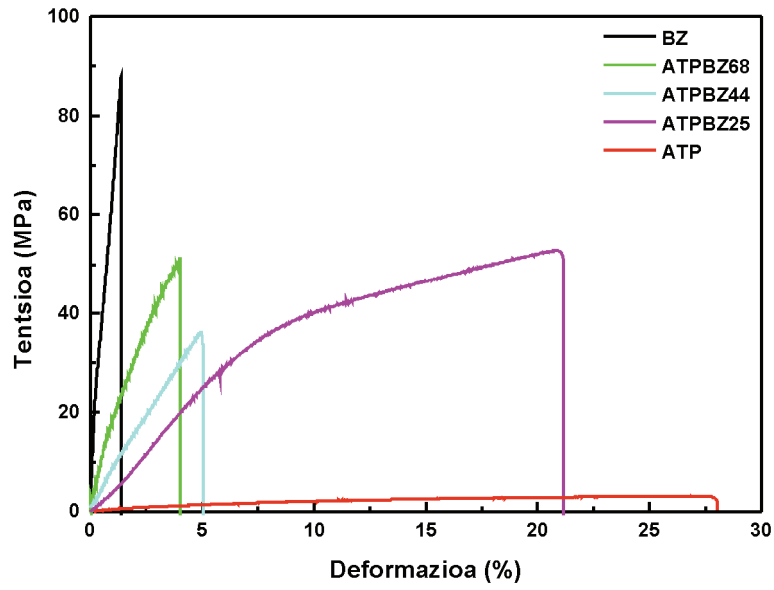
V.3.3. Portaera mekanikoa

Osagai puruen eta bionanokonposite sistema ezberdinen trakzio saiakuntzan lorturiko tentsio-deformazio kurbak eta trakzio erresistentzia, modulu elastiko eta haustura deformazio balioak **V.9. Irudian** eta **V.10. Irudian** aurkezten dira.

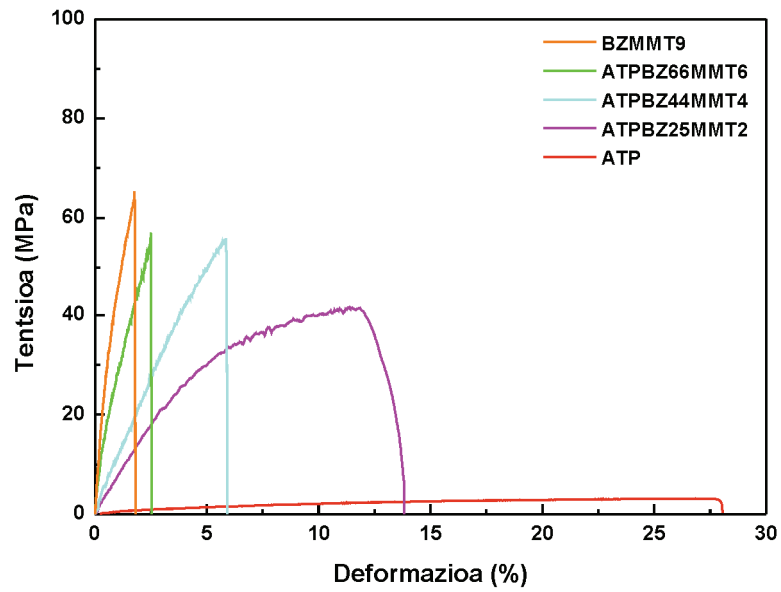
ATP matrizeari dagokionez, BZ puruarekin alderatuz, erresistentzia eta modulu oso baxuak eta deformazio altua aurkezten ditu. Eraitzen arabera, ATP matrizeari erresistentzia eta modulu altuko BZ gehitzeak, ATPBZ sistemaren propietate mekanikoak hobesten ditu, erresistentzia eta elastikotasun modulua handituz. Ikus daitekeenez, bionanokonpositeen haustura deformazioa txikitu egiten da, BZ edukiarekiko menpekota izanik. Eraitza hauek bat datoz, beste autore batzuek almidoian oinarritutako konpositeetan ikusitako eraitzekin, non zelulosa errefortzu gisa erabiltzean trakzio erresistentzian eta moduluan hobekuntzak antzeman zituzten. Hauen arabera, bi osagaien artean sortutako elkarrekintzek propietate mekanikoetan eragin positiboa izan dezakete (Anglès eta Dufresne, 2000).

ATPBZMMT bionanokonpositeei dagokionez, ATPBZ homologoekin alderatuz, BZMMT edukia handitzean, orokorrean tentsioa eta elastikotasun modulu handiagoak lortu dira. Literaturaren arabera, nanokargek (nanobuztin, nanokristal,...) almidoi filma indartzen dute, trakzio erresistentzia eta modulu elastikoa handituz (Ul-Islam et al., 2012; González et al., 2015). Aldiz haustura deformazioari dagokionean, ATPBZ sistemekin alderatuz, balio naba rmen txikiagoak aurkezten dituzte. Aurretik aipatu bezala, alde batetik almidoiaren osagaiek afinitate ezberdina aurkeztu lezakete BZ edo BZMMT9 mintzekiko eta bestetik MMT-a gehitzeak, BZMMT9 mintz trinkoagoa sortzea dakar eta honek ATP-ren barneratzea BZMMT9 mintzaren zehar eragotzi dezake. Honen arabera, ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonposite sistemetan propietate mekanikoak, osagaien distribuzioarekiko menpekotasuna izan dezaketela iradokitzen dute (Curvelo et al., 2001; Wilhelm et al., 2003; Ma et al., 2008; Almasi et al., 2010).

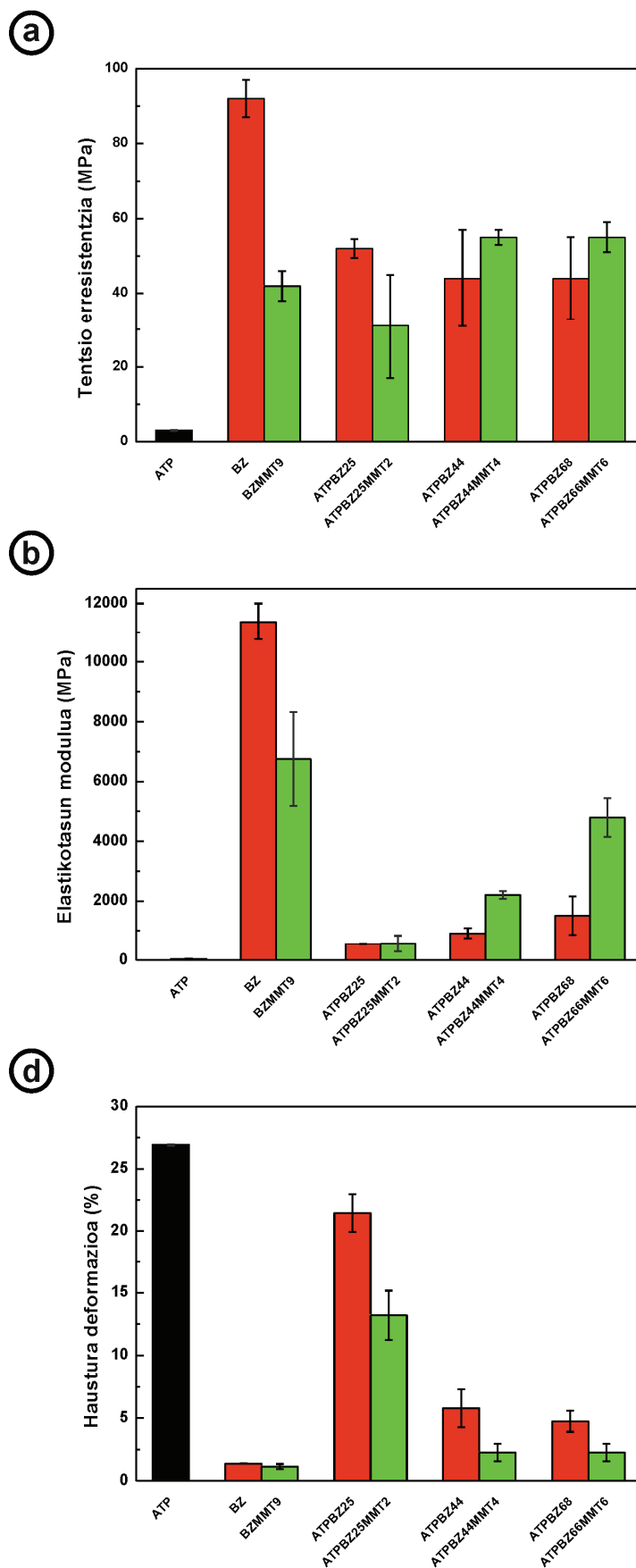
(a)



(b)



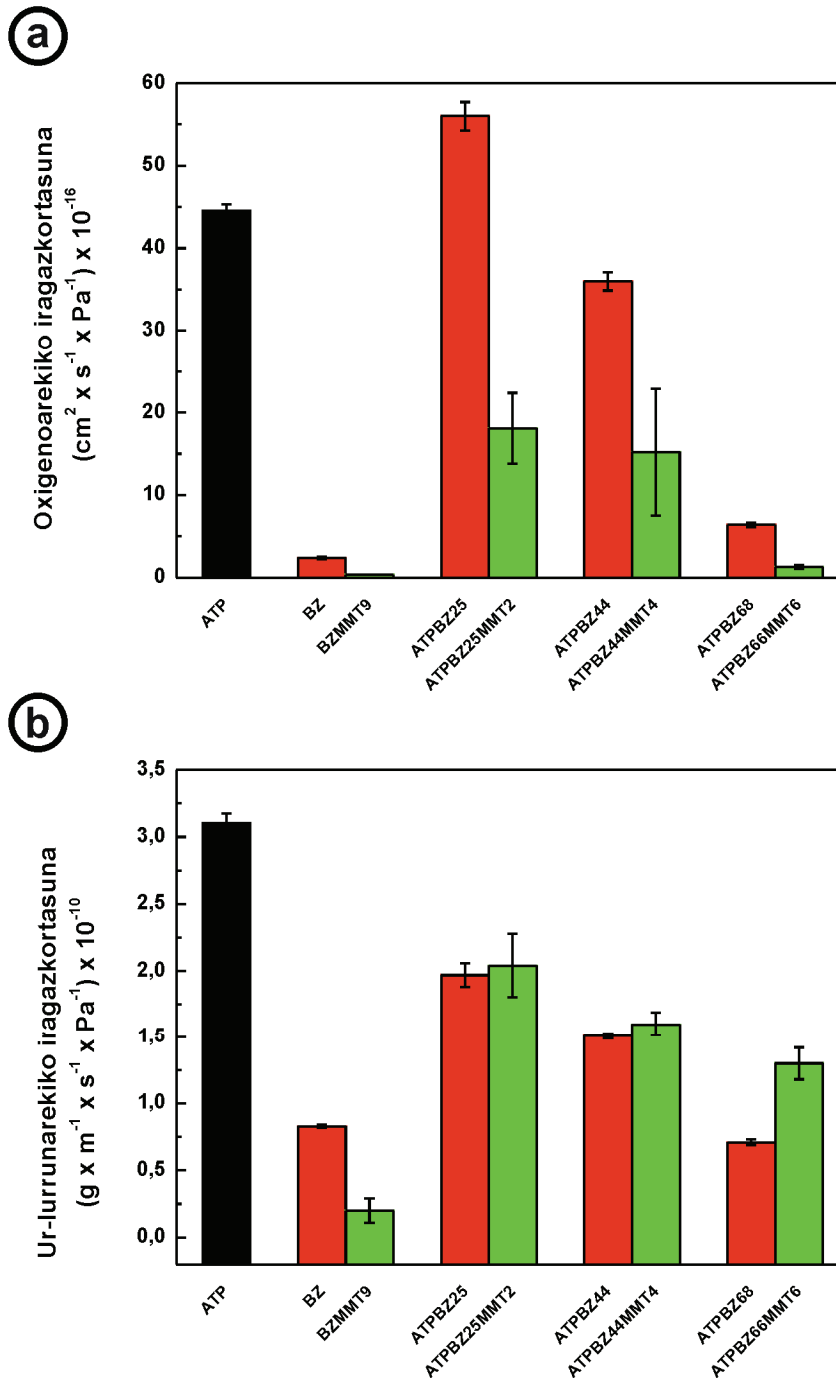
V.9. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen tentsio-deformazio kurbak:
a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.



V.10. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen: a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak.

V.3.4. Iragazkortasun azterketa

Oxigenoarekiko (*OI*) eta ur-lurrunarekiko iragazkortasunaren (*ULI*) batuz besteko balioak V.11. Irudian azaltzen dira.



V.11. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen: a) Oxigenoarekiko eta b) Ur-lurrinarekiko iragazkortasunak.

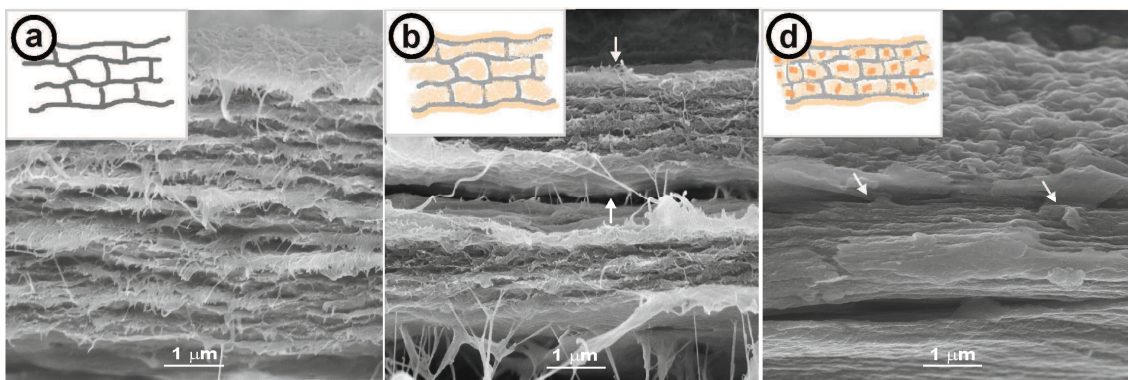
Almidoiaren oxigeno eta ur-lurrunarekiko hesi propietateak hainbat faktoreren menpekoak dira, alde batetik almidoi filmen konposizioa (amilosa/amilopektina edukia,

plastifikatzaile edukia eta plastifikatzaile bezala joka dezakeen ur edukia) eta bestalde filmaren lodiera eta ingurugiroko hezetasuna (Forsell et al., 2002; Alves et al., 2007; Gonzalez et al., 2015). Lan honetan prestatutako almidoi filmek, bibliografian aurkitu diren hesi propietateen balioak (oxigenoarekiko eta ur lurrunarekiko iragazkortasuna) baino arinki balio okerragoak aurkezten dituzte. Bibliografian, almidoi konposizio ezberdinentzat oxigenoaren iragazkortasun balioak, $0,1-7 \times 10^{-16}$ ($\text{cm}^2 \times \text{Pa}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) (Gaudin et al., 2000; Forsell et al., 2002) tartean aurkitzen dira eta urarekiko $2 \times 10^{-10}-1 \times 10^{-9}$ ($\text{g} \times \text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1} \times \text{Pa}^{-1}$) (Bertuzzi et al., 2007). Iragazkortasun balioek hobekuntza handia jasaten dute BZ mintzarekin. Nanoentitateekin lorturiko nanokonpositeek, polimeroen hesi propietateetan aldaketa nabarmenak eragiten dituztela ikusi izan da (Ray eta Okamoto, 2003) eta badira hainbat lan, almidoia eta nanoentitate ezberdinekin lortutako konpositeetan, hesi propietateen hobekuntzak ikusi dituztenak (Chang et al., 2010; Yu et al., 2008). *OI*-ren kasuan, beste autore batzuk ikusi zuten moduan, badirudi zelulosa nanozuntzek filmetan zehar oxigeno molekulen garraioa oztopatzen dutela bide bihurtunetsua sortuz, eta beraz, BZ edukia handitzen denean, oxigenoarekiko hesi-propietateak hobetzen dira, hobekuntza hau BZ eduki altuenentzat %80-koa izanik. Ur-lurrunari dagokionean, hesi propietateek hobekuntza nabarmena jasan dute BZ edukia handitzen doan heinean (%77-rainoko jaitsiera jasaten duen *ULI*-ak), eta efektu hau zelulosa nanozuntzek sortzen duten bide bihurtunetsuaz gain, baliteke beste faktore batzuek ere baldintzatua egotea. Izan ere, hainbat autorek ikusi duten moduan, zelulosaren izaera hidrofilikoa dela eta baliteke filmean zehar pasatzen diren ur molekula eta filmaren egitura osatzen duten materialen talde polarren artean elkarrekintzak sortzea eta modu honetan ura filmean atxikituta geldituko litzateke (Dufresne et al., 2013; Hietala et al., 2013).

Bestalde, MMT duten ATPBZMMT sistemetan lorturiko emaitzak aztertuz, espero moduan (IV. atalean BZMMT9-aren iragazkortasun propietateak aztertuz) BZMMT9 gehikuntzak, bionanokonpositeen hesi propietateetan hobekuntzak eragiten dituela ikus daiteke bai oxigeno eta baita ur-lurrunari dagokionean. Gainera, aurretik BZ-rekin ikusi den moduan, BZMMT edukia handitzean, hesi propietateak ere hobetzen dira. Hainbat lanetan ikusi izan da, nanobuztin xaflek gasen garraioa oztopatzen dutela, bide bihurtunetsuak sortuz (Zeppa et al., 2009). Lan honetan, BZMMT9-arekin indarturiko bionanokonpositeetan, hesi propietateen hobekuntza nabarmenagoa da oxigenoarekiko, ur-lurrunarekiko baino eta baliteke bionanokonpositeak osatzen dituzten osagaien berezko izaera hidrofila eta analisi termograbitriko eta dinamiko mekanikoan aipatu den glizerolaren migrazioak eragina izatea propietate honetan ere.

V.3.5. Morfologia azterketa

Bionanokonposieen azterketa morfologikoa burutzeko mikroskopia elektronikoa erabili da. Horretarako, BZ puruaren eta ATPBZ25 eta ATPBZ25MMT2 bionanokonposieen azterketa burutu da, hain zuzen ere. Lorturiko zeharkako sekzioaren SEM irudiak **V.12. Irudian** azaltzen dira. Agerikoa denez, desberdintasun morfologikoak nabariak dira lagin guztien artean. BZ (**V.12a. Irudia**) irudian, geruzaz osaturiko egitura hierarkiko antolatua antzematen da, BZMMT9 laginarentzat aldiz (IV. atalean aurkeztua), MMT nanobuztin xaflek BZ nanozuntza inguratuz, egitura trinkoa aurkeztu dute. Bionanokonpositeei dagokionez, ATPBZ25 laginaren kasuan (**V.12b. Irudia**), almidoi termoplastikoa zelulosa nanozuntzen zirrikietan barneratu dela ikus daiteke, geruza artean tartekaturik nabarmentzen baita. Emaitza hauek bat datoz bai filmeek erakutsi duten gardentasunarekin (BZ lagin puruarekiko) eta baita propietate mekanikoetan laginek aurkeztu duten haustura deformazioaren handitzearekin non ATP-ren inpregnazioa ematen dela berresten duten. Azkenik, bionanokonposite hibridoari dagokionez (**V.12d. Irudia**), oso egitura trinkoa aurkezten duela antzematen da eta zelulosa nanozuntzek osaturiko geruza tarteak bai ATP eta baita nanobuztin xaflez inguraturik daudela ikus daiteke.



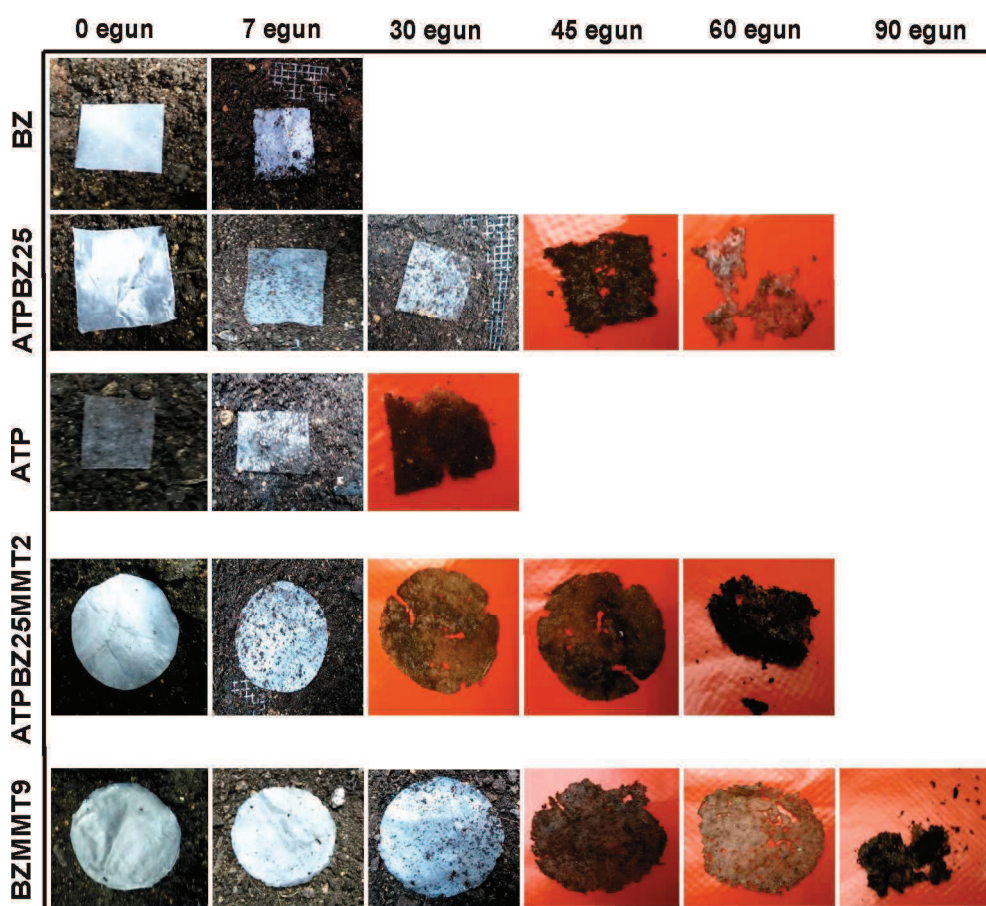
V.12. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta bionanokonposite sistema ezberdinetako zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a) BZ lagina, b) ATPBZ25 eta d) ATPBZ25MMT2 bionanokonpositeak.

V.3.6. Biodegradagarritasun azterketa

Atal honetan, bionanokonpositeak prestatzeko erabilitako lehengaiak jatorri berriztagarritik eratorritako materialak izanik, bukaerako bionanokonpositeen biodegradagarritasuna bermatzeak, ontziratze aplikazioetan abantaila handiak ekarriko lituzke. Hori dela eta, film puruen, hots, BZ, BZMMT9 eta ATP eta (BZ eta MMT) portzentaia baxuko bionanokonposite sistemen biodegradagarritasun saiakuntzak

burutu dira. Horretarako, laginak lurpean murgildu dira eta materialen itxuraren bilakaera argazkien bidez aztertuz, biodegradazioaren ideia kualitatibo bat lortu da.

V.13. Irudian, BZ, BZMMT, ATP eta aukeraturiko bionanokonpositeak lurpean murgildurik jasan duten bilakaera, denbora ezberdinetan lortutako irudi digitalen bitartez aztertu da. Ikus daitekeenez, lehen hilabete eta erdian (45 egun) lurperatu ondoren, BZ eta ATP lagin puruak guztiz desagertu ziren (ezin izan zen lagina errekuperatu). BZMMT-ren kasuan, lehen hilabetean ez da aldaketa nabarmenik bereizten baina, hortik aurrera laginaren gainazalean pitzadura batzuk nabarmentzen dira. Hortaz, BZ-rekin ez bezala, MMT nanokargekin indarturiko mintzan, degradagarritasun prozesua atzeratzen dela baieztatu daiteke.



V.13. Irudia. Denbora ezberdinetan BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen irudi digitalak, lurpean murgilduriko biodegradagarritasun saiakuntzan.

Bionanokonpositeetan, nahiz eta osagai puruekin konparatuz degradazio prozesua atzeratu da, lehen hilabetean laginak gardentasuna galtzen hasten direla antzematen da, eta gainera lehen zulo txoak antzeman daitezke. Dena den, prestatuturiko bionanokonpositeen degradazio prozesua atzeratu den arren, osagai ezberdinen

izaera berriztagarri eta biodegradagarriaren eraginez, bionanokonpositeen biodegradagarritasuna bermatzen dela baieztatzen da emaitzen arabera, 90 egun buruan lagina ia guztiz desagertzen baita.

V.4. ONDORIOAK

Lan honetan, BZ eta BZMMT9 eduki altuko (25-68%) ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonposite gardenak prestatu dira inpregnazioa edo *ex-situ* teknikaren bidez. Propietate optikoei dagokionez, bionanokonposite sistema ezberdinetan gardentasuna handitzen da ATP edukia handitzen den heinean, ATPBZ sisteman nabarmenagoa izanik. *FTIR-ATR*-ren emaitzen arabera, ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonpositeetan ez da espeketroen arteko ezberdintasunik antzeman MMT edukia txikia dela eta. Bestalde, *TGA* eta *DMA* emaitzen arabera, ATP osatzen duten osagai sistema tertziarioak (almidoi-glizerol-ura) BZ eta BZMMT9 mintzekin afinitate desberdinak erakutsi ditu eta honen ondorioz, osagaien migrazioa ezberdina dela eta, bionanokonpositeen almidoi osagaien konposizioa aldatzen da. BZ eta BZMMT9 presentziari esker, bionanokonpositeak ATP filmarekiko propietate mekaniko hobetuak aurkezten dituzte, nanozelulosaren hiru dimentsioko sare-ordenatuari esker, ATP-aren indargarri eraginkorra bezala jokatu. Halaber, iragazkortasun propietatearen hobekuntza, BZ eta BZMMT9 mintzek sortutako bide bihurtu ondorio da. Gainera, *SEM* bidez bionanokonpositeetan ikusiriko egitura trinkoak eta lorturiko propietate mekaniko zein hesi-propietateek, BZ eta BZMMT9 mintzen inpregnazioa baieztatzen da. Honez gain, prestatutako bionanokonpositeek biodegradagarritasuna mantentzen dute. Hortaz, bionanokonposite hauek duten gardentasun altua, oxigenoarekiko iragazkortasuna eta propietate mekaniko hobetuak, aplikazio ugari erabiltzeko egokiak bilakatzen dituzte.

V.5. BIBLIOGRAFIA

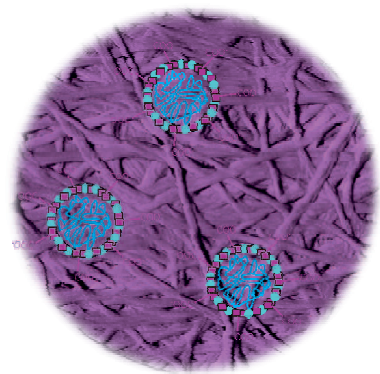
- Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Entezami, A. A. (2010). *Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films*. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 1-5.
- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A., Grossmann, M. V. E. (2007). *Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties*. Journal of Food Engineering, 78, 943-946.
- Angellier, H., Molina-Boisseau, S., Dole, P., Dufresne, A. (2006). *Thermoplastic starch-waxy maize starch nanocrystals nanocomposites*. Biomacromolecules, 7, 531-539.
- Anglès, M. N., Dufresne, A. (2000). *Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 1. Structural analysis*. Macromolecules, 2000, 33, 8344-8353.
- Anglès, M. N., Dufresne, A. (2001). *Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposite materials. 2. Mechanical behavior*. Macromolecules, 34, 2921-2931.
- Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. F. C., Armada, M., Gottifredi, J. C. (2007). *Water vapor permeability of edible starch based films*. Journal of Food Engineering, 80, 972-978.

- Biagini, E., Lippi, F., Petarca, L., Tognotti, L. (2002). *Devolatilization rate of biomasses and coal-biomass blends an experimental investigation*. Fuel, 81, 1041-1050.
- Chang, P. R., Jian, R., Zheng, P., Yu, J., Ma, X. (2010). *Preparation and properties of glycerol plasticized-starch (GPS)/cellulose nanoparticle (CN) composite*. Carbohydrate Polymers, 79, 301-305.
- Cheng, K., Winter, W. T., Stipanovic, A. J. (2012). *A modulated-TGA approach to the kinetics of lignocellulosic biomass pyrolysis/combustion*. Polymer Degradation and Stability, 97, 1606-1615.
- Chivrac, F., Angellier-Coussy, H., Guillard, V., Pollet, E., Avérous, L. (2010). *How does water diffuse in starch/montmorillonite nano-biocomposite materials?*. Carbohydrate Polymers, 82, 128-135.
- Curvelo, A. A. S., de Carcalho, A. J. F., Agnelli, J. A. M., Vazquez, A. (2001). *Thermoplastic starch-cellulosic fibers composites: preliminary results*. Carbohydrate Polymers, 45, 183-188.
- Cyras, V. P., Zenklusen, M. C. T., Vazquez, A. (2006). *Relationship between structure and properties of modified potato starch biodegradable films*. Journal of Applied Polymer Science, 101, 4313-4319.
- Cyras, V. P., Manfredi, L. B., Ton-That, M. T., Vazquez, A. (2008). *Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films*. Carbohydrate Polymers, 73, 55-63.
- Dufresne, A., Thomas, S., Pothan, L. A. (2013). *Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications*. Eds. Alain Dufresne, Sabu Thomas, Laly A. Pothan, Print ISBN: 9781118218358. Online ISBN: 978111860995
- Figueiredo, A. G. P. R., Figueiredo, A. R. P., Alonso-Varona, A., Fernandes, T., Palomares, T., Rubio-Azpeitia, A., Barros-Timmons, A., Silvestre, Neto, C. P., Freire, C. S. R. (2013). *Biocompatible bacterial cellulose-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films*. BioMed Research International, Article ID 698141.
- Forsell, P., Lahtinen, R., Lahelin, M., Myllärinen, P. (2002) *Oxygen permeability of amylose and amylopectin films*. Carbohydrate Polymers, 47, 125-129.
- García, N. L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M., Goyanes, S. (2011). *Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals*. Carbohydrate Polymers, 84, 203-210.
- Gaudin, S., Lourdin, D., Forsell, P. M., Colonna, P. (2000). *Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films*. Carbohydrate Polymers, 43, 33-37.
- González, K., Retegi, A., González, A., Eceiza, A., Gabilondo, N. (2015). *Starch and cellulose nanocrystals together into thermoplastic starch bionanocomposites*. Carbohydrate Polymers, 117, 83-90.
- Grande, C. J., Torres, G. F., Gomez, C. M., Troncoso, O. P., Canet-Ferrer, J., Martínez-Pastor, J. (2009). *Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites*. Materials Science and Engineering: C, 29, 1098-1104.
- Hietala, M., Mathew, A. P., Oksman, K. (2013). *Bionanocomposites of thermoplastic starch and cellulose nanofibers manufactured using twin-screw extrusion*. European Polymer Journal, 49, 950-956.
- Karimi, S., Dufresne, A., Tahir, Md., Karimi, A., Abdulkhani, A. (2014). *Biodegradable starch-based composites: effect of micro and nanoreinforcement on composite properties*. Journal of Materials Science, 49, 4513-4521.
- Lourdin, D., Bizort, H., Colonna, P. (1997). *"Antiplasticization" in starch-glycerol films?*. Journal of Applied Polymers Science, 63, 1047-1053.
- Ma, X., Yu, J., Kennedy, J. F. (2005). *Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastic starch composites*. Carbohydrate Polymers, 62, 19-24.
- Martins, I. M. G., Magina, S. P., Oliveira, L., Freire, C. S. R. Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Gandini, A. (2009). *New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose*. Composites Science and Technology, 69, 2163-2168.

- Nelson, M. L., O'Connor, R. T. (1964). *Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II.* Journal of Applied Polymers Science, 8, 1325-1341.
- Nowicki, L., Ledakowicz, S. (2014). *Comprehensive characterization of thermal decomposition of sewage sludge by TG-MS.* Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 110, 220-228.
- Ray, S. S., Okamoto, M. (2003). *Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing.* Progress in Polymer Science, 28, 1539-1641.
- Retegi, A., Algar, I., Martin, L., Stefani, P., Zuluaga, R., Gañan, P., Mondragon, I. (2012). *Sustainable optical transparent composite based on epoxidized soy-bean oil (ESO) matrix and high contents of bacterial cellulose (BC).* Cellulose, 19, 103-109.
- Tunç, S., Osman, D. (2010). *Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films.* Applied Clay Science, 48, 414-424.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012). *Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications.* Carbohydrate Polymers, 89, 189-1197.
- Van Soest, J. J. G., De Wit, D., Vliegthart, J. F. G. (1996). *Mechanical properties of thermoplastic waxy maize starch.* Journal of Applied Polymer Science, 61, 1927-1937.
- Vilpoux, O., Avèrous, L. (2004). In Book: *In Technology, Use and Potentialities of Latin American Starch Tubers.* Ed. Cereda, M. P., Vilboux, O. Sao Paulo. *Chapter 18: Starch-based plastics*, 521-553.
- Wang, Y., Rakotonirainy, A. M., Padua, G. W. (2003). *Thermal behavior of zein-base biodegradable films.* Starch, 55, 25-29.
- Wilhelm, H. M., Sierakowski, M. R., Souza, G. P., Wypych, F. (2003). *Starch films reinforced with mineral clay.* Carbohydrate Polymers, 52, 101-110.
- Yamamoto, H., Furmitaka, H. (1994). *In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influence of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I_α and I_β beta as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS)¹³C NMR spectroscopy.* Cellulose, 1, 57-66.
- Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. (1996). *In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I_α and I_β at the early stage of incubation.* Cellulose, 3, 229-242.
- Yano, H., Sugiyama, J., Nakagaito, A. N., Nogi, M., Matsumura, K., Hakita, M., Handa, K. (2005). *Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers.* Advanced Materials, 17, 153-155.
- Yin, Y., Li, J., Liu, Y. Li, Z. (2005). *Starch cross-linked with poly(vinyl alcohol) by boric acid.* Journal of Applied Polymer Science, 96, 1349-1397.
- Yu, Y.H., Lin, C. Y., Yeh, J. M., Lin, W. H. (2003). *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-clay nanocomposite materials.* Polymer, 44, 3553-3560.
- Yu, J. H., Wang, J. L., Wu, X., Zhu, P. X. (2008). *Effect of glycerol on water vapor sorption and mechanical properties of starch/clay composite film.* Starch, 60, 257-262.
- Zeppa, C., Gouanvé, F., Espuche, E. (2009). *Effect of a plasticizer on the structure of biodegradable starch/clay nanocomposites: Thermal, water-sorption, and oxygen-barrier properties.* Journal of Applied Polymer Science, 112, 2044-2056.

VI. Atala

BAKTERIO-ZELULOSA ETA URETAN OINARRITUTAKO POLIURETANO NANOKONPOSITEAK



VI. BAKTERIO-ZELULOSA ETA URETAN OINARRITUTAKO POLIURETANO NANOKONPOSITEAK

VI.1. HELBURUA

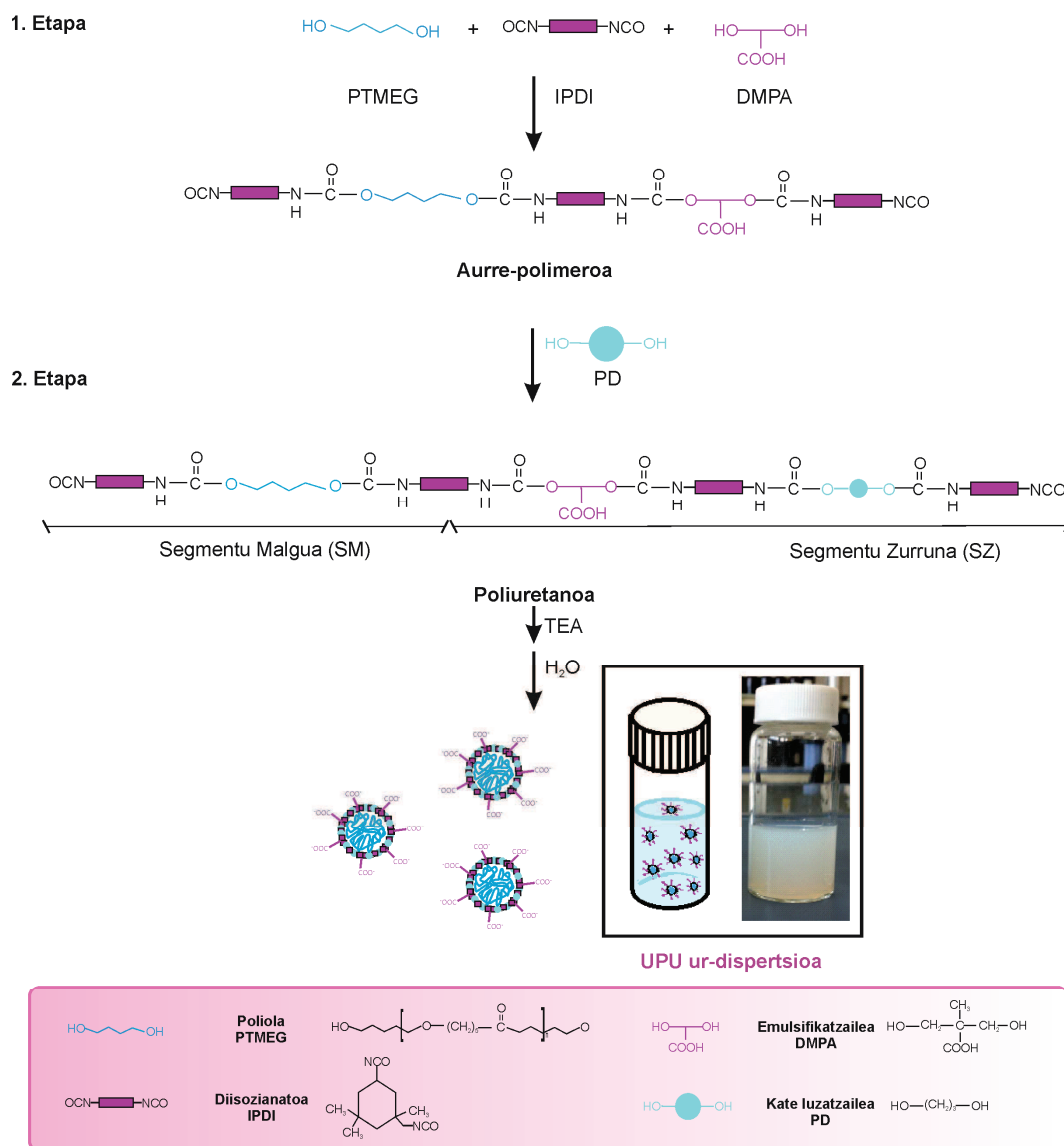
Atal honen helburua, jatorri berriztagarrietatik eratorritako erreaktiboekin sintetizaturiko poliuretanoetan oinarrituriko modulu eta erresistentzia altuko nanokonpositeak lortzea izan da. Horretarako uretan oinarritutako poliuretano eta BZ-rekin nanokonpositeak prestatu dira. Lehenik, masan %25-eko solido edukia duen poliuretano ur-dispertsio (UPU) egonkorra sintetizatu da bi etapako polimerizazioaren bidez. Ondoren, ur destilatuarekin diluituz, solido eduki ezberdineko UPU ur-dispertsioak prestatu dira. Azkenik, inpregnazio edo *ex-situ* teknika erabiliz, III. atalean azaldu den prozedura erabiliz biosintetizatu den BZ mintza, solido eduki ezberdineko poliuretano ur-dispertsio ezberdinetan murgildu da, BZ eduki ezberdineko nanokonpositeak prestatu direlarik. Hortaz, nanokonpositeen karakterizazioan teknika fisiko-kimiko, termiko, mekaniko eta morfologikoak erabili dira. Nanokonpositeen urarekin aktibaturiko itxura-oroimena eta ur-lurrunarekiko iragazkortasuna ere aztertu da.

VI.2. PROZEDURA EXPERIMENTALA

VI.2.1. Uretan oinarritutako poliuretanoaren sintesia

Aipatu moduan, poliuretano ur-dispertsio (UPU) egonkorra sintetizatu da. Segmentu malgu gisa (SM), arto azukretik eratorritako politrimetileno eter glikola (PTMEG) erabili da. PTMEG-ren jatorri berriztagarrietatik eratorritako karbono edukia ASTM D6866-04 (ASTM, 2004) araua jarraituz, %100-ean determinatu da. Hidroxilo zenbakiari dagokionean, ASTM D4274-05 (ASTM, 2005) araua jarraituz, balorazio bidez 79,4 mg KOH x g⁻¹-ean zehaztu da, eta bere funtzionalitatea 2 izanik, 1412 g x mol⁻¹-ko masa molekularra determinatu da. Poliola erabili aurretik hutsune bidez errotabapore batean (50 °C eta 4 orduz) lehortu da. Segmentu zurrunari (SZ) dagokionean, Covestro etxeko isoforona diisozianatoaz (IPDI), eta Aldrich etxeko azido 2,2-bis(hidroximetil)propioniko (DMPA) barne emultsio eragileaz eta 1,3-propanodiola (PD) kate luzatzaileaz eratua dago. Erabili aurretik, bai DMPA-a eta bai PD-a, hutsune bidez errotabapore batean (50 °C eta 4 orduz) lehortu dira. Katalizatzaile gisa eta DMPA-ren talde azidoak neutralizatzeko, Aldrich etxeko eztairu dibutil dilauratoa (DBTL) eta trietilamina (TEA), hurrenez hurren, erabili dira. Erreakzio nahastearen liskatasuna Macron Fine Chemicals etxeko tetrahidrofuranoaz (THF) kontrolatu da.

Polimerizazioa, nitrogeno giroan bi etapatan burutu da, olio bainu termostatizatu batean dagoen eta irabiagailu mekaniko, termometro eta kondentsadore batekin hornitutako 250 mL-ko matraze batetan. Lehen etapan, PTMEG-a, IPDI-a eta DMPA-a 90 °C-tan erreakzionarazi dira masan %0,1 DBTL katalizatzailea gehituz, poliuretano aurre-polimeroa lortuz. Bigarren etapan, temperatura berdinean PD kate luzatzailea gehitu da. Ondoren, nahastea 55 °C-raino hoztu da, liskatasuna THF-arekin kontrolatuz eta azido taldeak neutralizatzeko TEA gehitu da. Azkenik, erreakzio-nahastea 25 °C-taraino hoztu da eta poliuretano ur-dispertsioa eratzeko, ur desionizatua tantaka eta abiadura handian irabiatuz gehitzen da. Dispertsioan gera daitekeen THF-a hutsunepean errotabapore batekin eliminatu da, %25 solido edukia duen poliuretano ur-dispertsioa lortuz. **VI.1.Irudian**, erreakzio-prozesuaren eskema aurkezten da.



VI.1. Irudia. Uretan oinarritutako poliuretanoaren sintesiaren eskema.

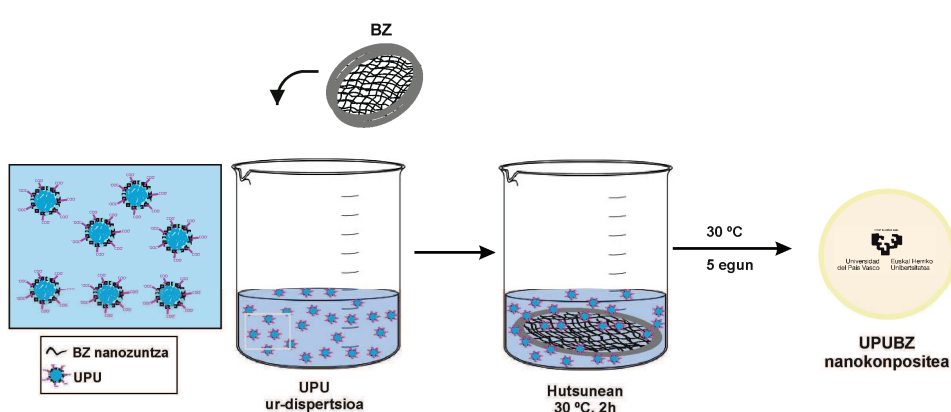
PTMEG:DMPA:IPDI:PD osagaien arteko erlazio molarra, 0,5:0,5:2,1:1 erabili da, %46 segmentu zurrun edukia duen poliuretanoa lortuz. Isozianato eta hidroxilo taldeen erlazioa, NCO/OH, 1,05 izan da. Gehiegizko isozianatoa erabiltzean PTMEG, DMPA eta PD-rekin erreakzio osoa ematen dela ziurtatzeaz gain, urarekin ere erreakziona dezakeela kontuan izan behar da.

UPU dispertsioaren egonkortasuna aztertzeko, partikula tamaina eta tamaina distribuzioa aztertzea ezinbestekoa da. Orokorrean, partikula tamaina handiak (>1 μm) dispertsio ezegonkorra dakar, partikulen prezipitazioa dela eta. Aldiz, partikula tamaina txikiak, orokorrean dispertsio egonkorrak lortzea ahalbidetzen dute. Gainera, partikula tamaina txikiagoei esker sortzen den gainazal energia altuagoaren ondorioz, filmen eraketarako indar-gidatzailea handiagoa da (Kim, 1996). Ura gehitzen den unean, partikula egonkortzen duten talde azidoak dituen poliuretanoak nukleo-azal edo *core-shell* egitura hartzen du. Gehienetan, talde ionikoak dituen segmentua gainazalean kokatzen da azala eratuz, segmentu hidrofobikoak berriz, babesturik aurkitzen dira nanopartikulako nukleoa eratuz (Mequanint eta Sanderson, 2006; Bullermann et al., 2013). Sintetizaturiko poliuretanoaren partikula tamaina eta tamaina polisakabanatzea, argi dispertsio dinamikoaz, $48,5 \pm 0,5$ nm eta $0,11 \pm 0,06$ -tan, hurrenez hurren, neurtu dira, **VI.1. Irudian** agertzen den dispertsio egonkorra sintetizatu delarik. Poliuretanoaren masa molekularra eta polisakabanatzea eskusio molekularrezko kromatografiaz determinatu da, pisuan batez besteko masa molekularra, \bar{M}_w , $31700 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$, zenbakizko batez besteko masa molekularra, \bar{M}_n , $11100 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ eta polisakanatzea 2,85 lortu direlarik.

VI.2.2. Bakterio-zelulosa eta uretan oinarritutako poliuretano nanokonpositeen prestakuntza

BZ mintza aurreko III. atalean erabilitako protokolo bera jarraituz, ez-ohiko ingurune eta baldintza estatikoan, biosintetizatu da. BZ eduki ezberdineko UPUBZ nanokonpositeak prestatu ahal izateko, lehenik, solido eduki ezberdineko UPU ur-dispertsioak prestatu dira, horretarako, aurretik (VI.2.1. sekzioan) sintetizaturiko UPU dispertsioa ur distilatuarekin diluitu delarik. Hortaz, %22,5, 15, 7,5 eta 2,5-eko solido edukia duten dispertsioak prestatu dira. UPUBZ nanokonpositeak, inpregnazioz edo *ex-situ* teknika erabiliz prestatu dira, V. atalean, almidoi nanokonpositeak prestatzeko erabili den prozedura berbera jarraituz. Lehenik, biosintetizaturiko BZ mintzetik $2 \times 2 \text{ cm}^2$ -ko zati txikiak moztu dira (eduki bakoitzerako bost lagin) eta solido eduki ezberdineko poliuretano ur-dispertsioan murgildu dira. UPU-arekin BZ mintzaren

bustitzea errazteko, mintz zati bakoitza dispertsioan 2 orduz eta 30 °C-ko tenperaturan hutsunepean mantendu da. Ondoren, UPU-z inpregnatutako mintzak, dispertsiotik atera eta 30 °C-tan 5 egunez lehortu dira, horrela BZ eduki ezberdineko UPUBZ nanokonpositeak prestatuz. Lehortze prozedura berdina jarraituz, BZ mintzaren 2 x 2 cm²-ko zatietatik abiatuz, BZ puru laginak prestatu dira. Erreferentzia gisa, sintetizaturiko UPU dispertsiotik *casting* bidez UPU film bat prestatu da, klima-kamera batean Tefloizko molde batean 25 °C-tan eta %50-eko hezetasun erlatiboan 7 egunez lehortzen utziaz. Karakterizazioa burutu aurretik, laginak giro tenperaturan eta %43-ko hezetasun erlatiboan, potasio karbonato soluzio ase bat duen lehorgailu batean mantendu dira. **V.2. Irudian** nanokonpositeen prestaketarako jarraitu den prozeduraren eskema azaltzen da. Nanokonposite bakoitzaren BZ edukia, BZ film puruaren eta nanokonposite filmaren pisuen diferentziaz kalkulatu da. **V.1. Taulan** laginen izendapena eta osagai bakoitzaren edukiak aurkezten dira.



VI.2. Irudia. 2 x 2 cm²-ko BZ mintz zati batetik eta UPU ur-dispertsio batetik abiatuz, UPUBZ nanokonpositea prestatzeko jarraituriko prozeduraren eskema.

VI.1. Taula. Laginen izendapena eta BZ-ren edukia sintetizaturiko nanokonpositeetan.

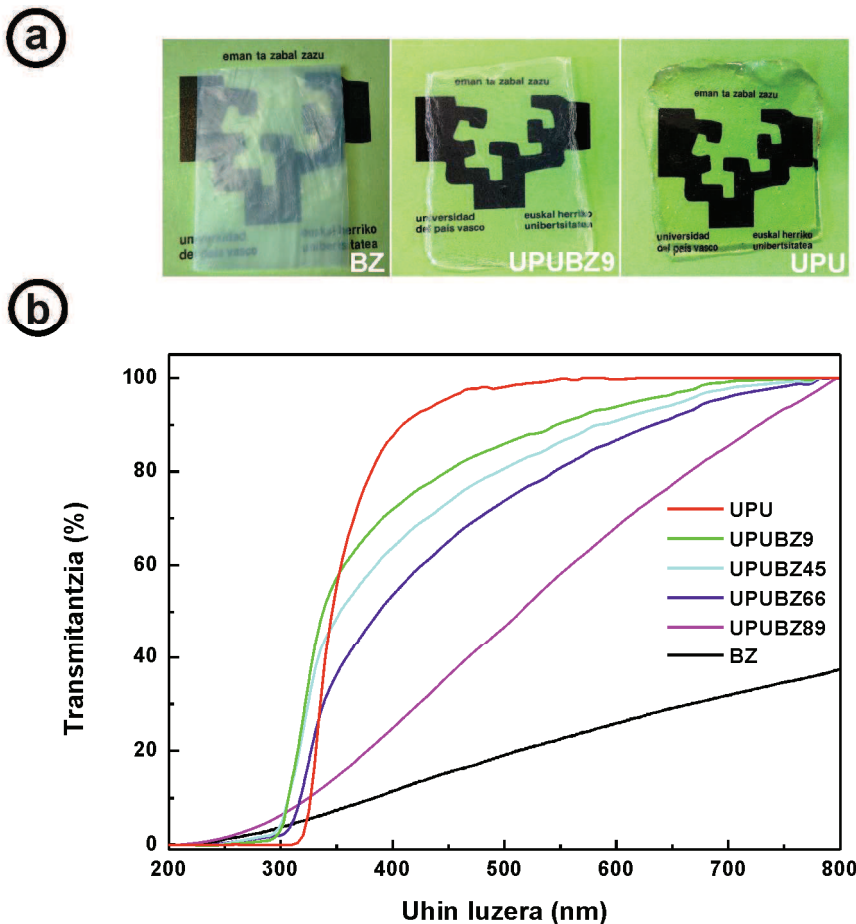
Sistema	UPU ur-dispertsioaren solido-edukia (%)	Nanokonpositeen BZ edukia (%)
UPU	25,0	-
UPUBZ9	22,5	9 ± 2,4
UPUBZ45	15,0	45 ± 2,0
UPUBZ66	7,5	66 ± 8,0
UPUBZ89	2,5	89 ± 2,2
BZ	0,0	100 ± 0,0

VI. 3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

VI.3.1. Azterketa fisiko-kimikoa

Gardentasun azterketa

BZ, UPU eta beraien UPUBZ nanokonpositeen gardentasuna izpi ultramore-ikuskorreko (*UV-ikus*) espektrofotometroaz aztertu da. **VI.3a. Irudian** BZ, UPU eta UPUBZ9 filmen irudi digitalak azaltzen dira, non hainbat ezberdintasun bereiz daitezkeen. BZ filma zeharrargia den bitartean UPU-a gardena da; bestalde UPU-a BZ mintzari gehitzean, UPUBZ9 nanokonpositea adibidez, gardena dela ikus daiteke. Hala ere, emaitza konparagarriak lortzeko azterketa kuantitatibo bat egitea beharrezkoa da. **VI.3b. Irudian**, sistema ezberdinen *UV-ikus* transmitantzia espektoak azaltzen dira.



VI.3. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonpositen:

a) Irudi digitalak eta b) Transmittantzia uhin luzeraren funtziopean.

UPU filmak gardentasun handia (%99-ko transmitantzia 600 nm-tan) duen bitartean, BZ-ak gardentasun baxua erakusten du (%26-ko transmitantzia 600 nm-tan) eta hau, BZ mintzaren berezko 3D-ko sare egiturari dagokio, non zelulosa nanozuntzen eta aire hutsuneen artean argiaren dispersioa gertatzen den (Retegi et al., 2012). UPUBZ nanokonpositeen transmitantzia gradualki handitzen da UPU edukia handitzen den heinean. Emaiza hauek, bat datoz aurretik argitaratutako lanekin, zeintzuetan BZ-an oinarritutako nanokonpositeen gardentasuna, polimero gardenak gehituz handitzen zela ikusi zuten (Retegi et al., 2012; Pinto et al., 2015; Urbina et al., 2016). Opakotasunari dagokionean, II.7. ekuazioaz (II. atalean) kalkulatu da. **VI.2. Taulan** aurkezten diren opakotasun balioetan gardentasunaren alderantzizko joera ikus daiteke. Ikus daitekeenez, UPUBZ bionanokonpositeen opakotasunaren txikitzea oso nabarmena da, eta UPU edukia handitzen doan heinean gutxitzen da, UPU-ren gardentasunarekin erlazionaturik. Adierazgarria da, UPUBZ66 sisteman BZ edukia altua izanik ere, opakotasun balioak oso baxuak lortzen direla.

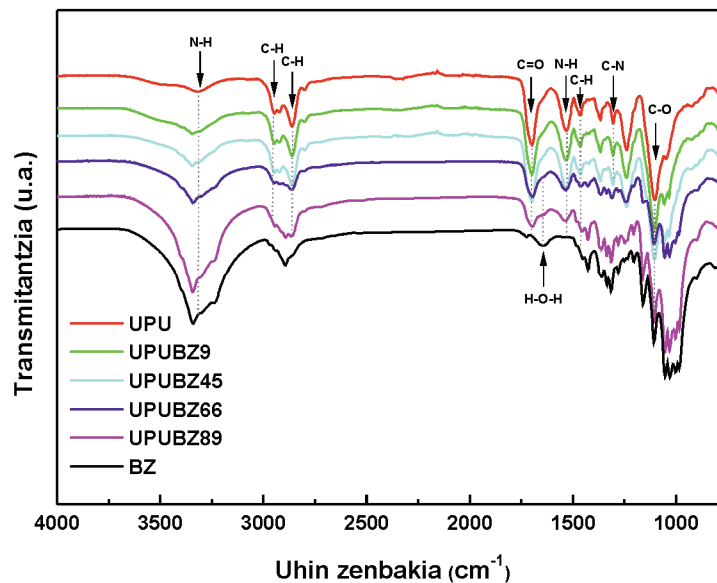
VI.2. Taula. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite ezberdinen opakotasun balioak.

Sistema	OP (u.a. x mm⁻¹)
UPU	0,01 ± 0,00
UPUBZ9	0,12 ± 0,03
UPUBZ45	0,31 ± 0,02
UPUBZ66	0,23 ± 0,01
UPUBZ89	2,70 ± 0,02
BZ	4,43 ± 0,06

Egitura kimikoa

UPU eta BZ film puruen eta UPUBZ nanokonposite filmen egitura kimikoa *FTIR-ATR* espektroskopiaz aztertu da, eta espektroak **VI.4. Irudian** azaltzen dira. BZ puruaren espektroan, aurretik (III. eta IV.ataletan) aipatu diren zelulosa I egiturari dagozkion absortzio pikuak ikus daitezke (Nelson eta O'Connor, 1964; Yamamoto eta Fumitaka, 1994; Yamamoto et al., 1996; Grande et al., 2009). UPU filmaren espektroan, 3320 eta 1698 cm⁻¹-tan, uretano taldearen N-H eta C=O loturei dagozkien tentsio bibrazio pikuak ageri dira, hurrenez hurren. Honez gain, 1535 eta 1305 cm⁻¹-tan N-H loturaren flexio bibrazioari eta C-N loturaren tentsio bibrazioari dagozkien pikuak ikus daitezke,

hurrenez hurren. $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ tartean eta 1463 cm^{-1} -ean CH eta CH_2 taldeen tentsio eta flexio bibrazioei dagozkien pikua ageri dira, hurrenez hurren. Era berean, $1200\text{-}975\text{ cm}^{-1}$ tartean aurkitzen diren pikua, uretano taldeko eta politrimetileno eter glikolaren C-O loturen tentsio bibrazioekin erlaziona daitezke. Hortaz, *FTIR-ATR* analisiak UPU-ren polimerizazioa eman dela baieztatzen du (Pereira eta Orefice, 2011; Floros et al., 2012; Santamaria-Echart et al., 2015; Hormaiztegui et al., 2016). UPUBZ nanokonpositeetan, BZ eta poliuretanoen absortzio banda esanguratsuenak azaltzen dira. BZ eduki handiko nanokonpositeetan (%66 eta 89-ko portzentaian), 3342 , 2895 eta 898 cm^{-1} uhin zenbakian azaltzen diren pikua, zelulosaren egitura dela eta nabarmenagoak bilakatzen dira. Era berean, xurgaturiko urarekin erlazonaturik dagoen pikua, 1647 cm^{-1} -tan, soilik zelulosa eduki handiko nanokonpositeetan ikusten da. BZ eduki txikienetan, %9 eta 45-ean hain zuzen ere, UPU-arekin erlazonaturiko absortzio pikua, 1698 , 1535 , 1463 eta 1305 cm^{-1} -tako uhin zenbakian, nabarmenagoak dira. Hortaz, *FTIR-ATR* teknikaz lortutako emaitzen arabera, inpregnazio prozesuan BZ mintzek UPU-a bereganatzen dutela iradokitzen dute, UPU eduki desberdineko UPUBZ nanokonpositeak prestatu direlarik.

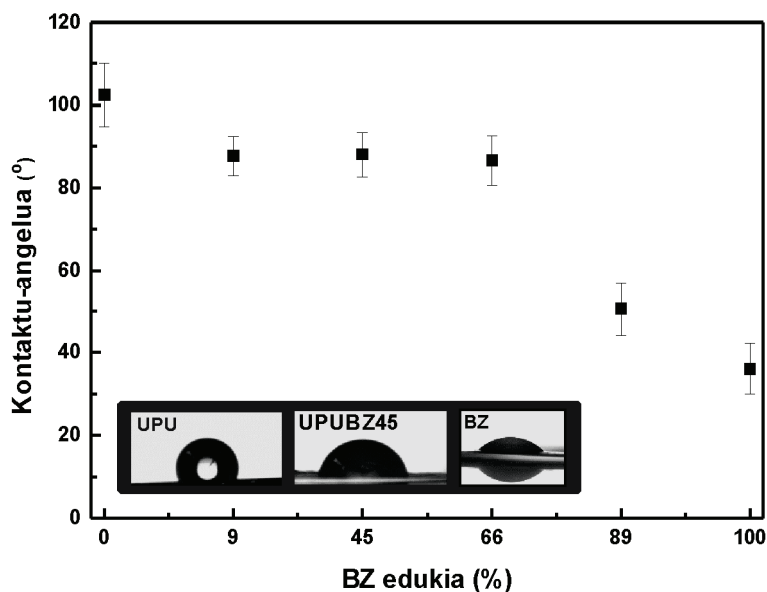


VI.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen *FTIR-ATR* espektroak.

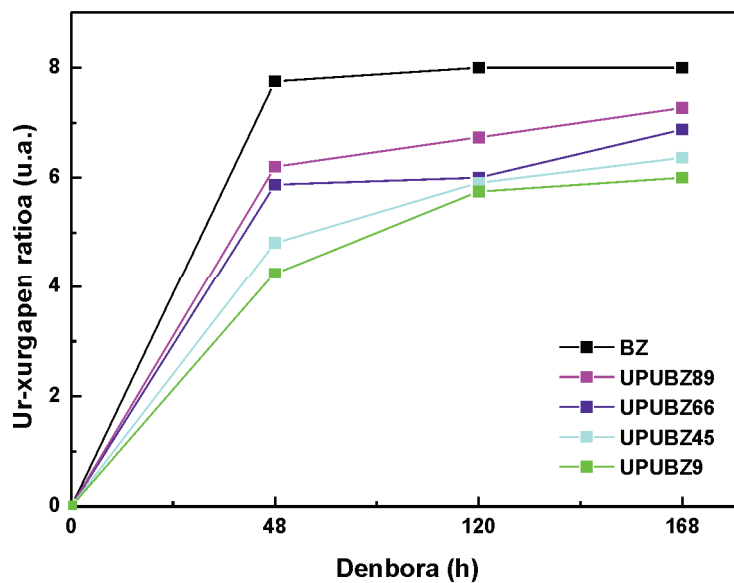
Kontaktu-angelua eta ur-xurgapena

UPU eta BZ puruen eta UPUBZ nanokonpositeen kontaktu-angeluak **VI.5a. Irudian** azaltzen dira.

a)



b)



VI.5. Irudia. a) Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite filmen kontaktu-angelua BZ edukiaren funtziopean eta b) sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta nanokonposite sistema ezberdinen ur-xurgapen ratioa denbora ezberdinetan.

Ikus daitekeenez, UPU-a polimero hidrofobikoa da eta kontaktu-angelu handiena aurkezten du (102°). BZ aldiz, hidrofilikoa da kontaktu-angelu baxuarekin (36°). Emaiza hauek bat datoz aurretik UPU eta BZ-rentzat argitaratutako balioekin, zeintzuetan BZ-ren berezko izaera hidrofilikoarekin (Saska et al., 2012) edo UPU-ren hidrofoboagoarekin (Santamaria-Echart et al., 2016) erlazionatzen dituzten, hurrenez hurren. UPUBZ nanokonpositeei dagokionean, UPU edukia handitzean, kontaktu-

angelu balio altuagoak neurtu dira, eta BZ mintzaren gainazalean UPU-a era egokian baneratu izanarekin erlaziona daitekeelarik (Urbina et al., 2016).

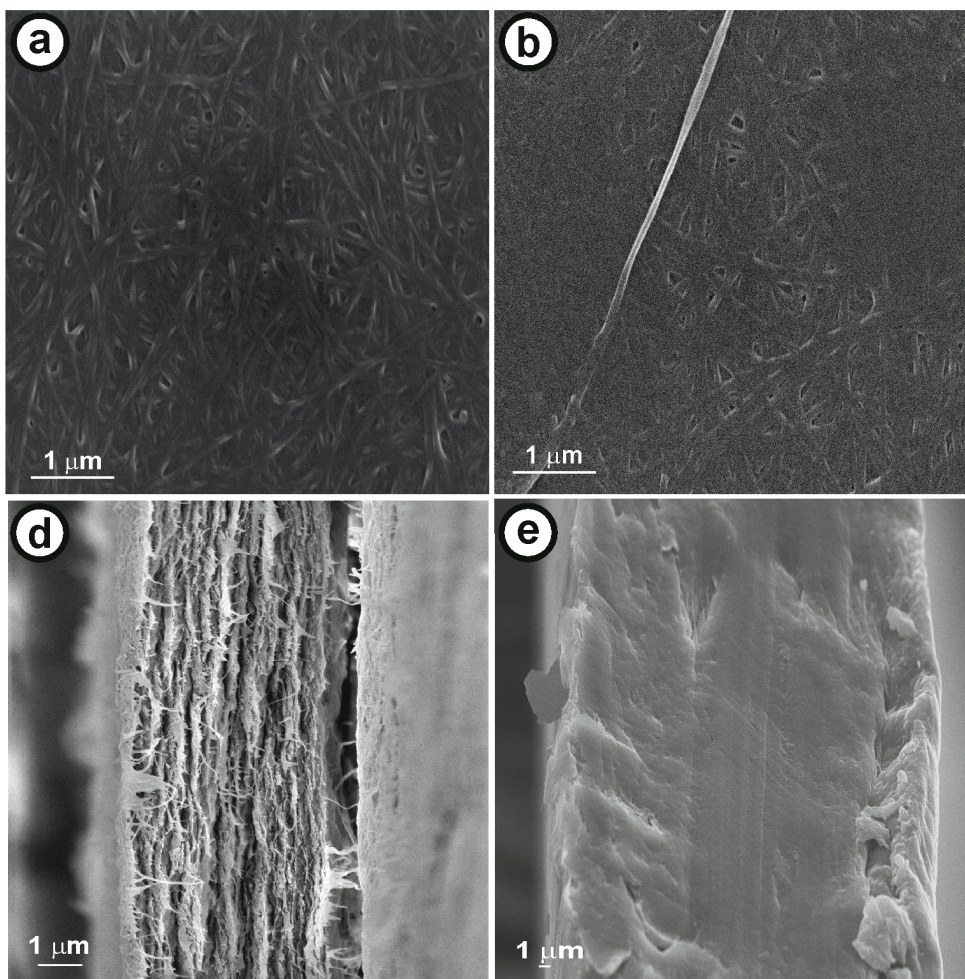
VI.5b. Irudian, BZ osagai puruaren eta UPUBZ nanokonpositeen (lagin bakarraren), ur-xurgapen ratioa (*UXR*) murgiltze denboraren funtziopean azaltzen da. Ikus daitekeen bezala, BZ filmak ur-xurgapen altuena aurkezten du, eta hau bere izaera hidrofiliokoari dagokio (Pinto et al., 2013). Nanokonpositeei dagokionean, BZ edukia handitzean ur-atxikipen gaitasuna ere handitu egiten da, UPUBZ89 nanokonpositeak ur-xurgapen ratio balio altuena erakusten duelarik. Emaidza hau, BZ-ren berezko izaera hidrofiliokoarekin, OH taldeen kopuru altua medio, erlaziona daiteke (Liu et al., 2014).

VI.3.2. Morfologia azterketa

VI.6. Irudian, BZ filmaren eta UPUBZ45 nanokonpositearen gainazaleko eta zeharkako ebakiduraz prestatutako sekzioaren *SEM* irudiak azaltzen dira, hurrenez hurren.

BZ filmaren gainazalak (**VI.6a. Irudia**), zelulosa nanozuntz luzeek eraturiko hiru dimentsioko (3D) sare egitura porotsua aurkezten du. BZ filmaren zeharkako ebakiduraz prestatutako gainazalari dagokionez (**VI.6d. Irudia**), arinki paketatutako zelulosa nanozuntzak ikus daitezke, aurretik ikusia izan den bezala (III. atala), zelulosa geruza paraleloak eratuz.

Nanokonpositearen gainazaleko *SEM* irudian ordea (**VI.6b. Irudia**), nahiz eta BZ nanozuntz batzuk oraindik bereizten diren, gainazalaren gehiengoan BZ nanozuntzak matrize polimerikoarekin estaliak azaltzen dira. Azkenik, nanokonposite laginaren zeharkako sekzioan (**VI.6e. Irudia**), BZ-rekin alderatuta, egitura trinkoago bat eta leunagoa ikus daiteke. Emaidza hauek, BZ mintza UPU-arekin modu eraginkor batean bustitzen dela iradokitzen dute, eta honek, *UV-ikus* emaitzen arabera, nanokonposite film gardenen prestaketa ahalbidetzen du. Horretaz gain, nanokonpositeek erakutsi dituzten ur-xurgapen balio txikiagoak UPU hidrofobikoaren gain, egitura trinkoagoarekin erlazionatuak leudeke.



VI.6. Irudia. Gainazal eta zeharkako sekzioaren SEM irudiak:
a), d) BZ laginarentzat eta b), e) UPUBZ45 nanokonpositearentzat.

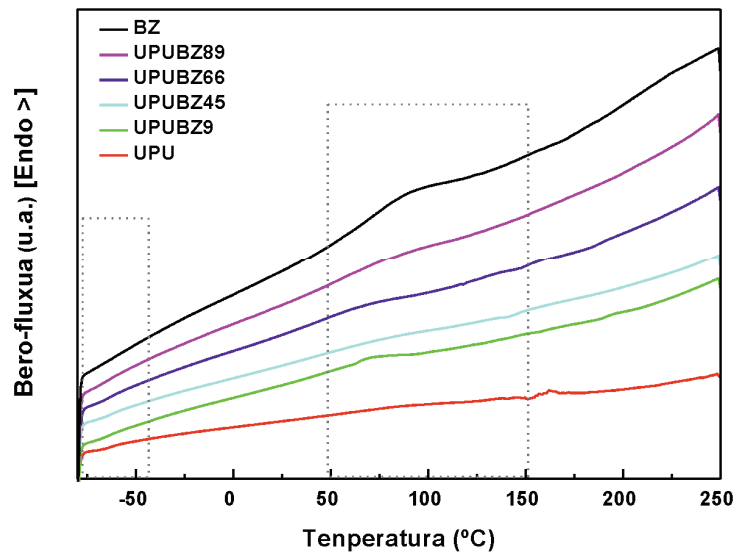
VI.3.3. Azterketa termikoa

Ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala (DSC)

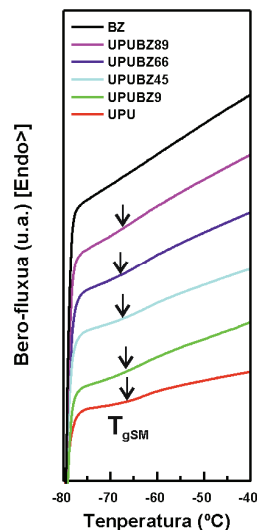
DSC saiakuntzen bidez, atal honetan sintetizatutako laginen trantsizio termikoak aztertu dira. **VI.7. Irudian**, BZ, UPU eta nanokonpositeen termogramak aurkezten dira. UPU filmean, bi trantsizio ikus daitezke, tenperatura baxuetan makrodiolean edo segmentu malguan aberatsa den fasearen beira trantsizioa (T_{gSM}), eta tenperatura altuagoetan IPDI-DMPA-PD-an edo segmentu zurrunean aberatsa den fasearen beira trantsizioa (T_{gSZ}), hurrenez hurren, poliuretanoa mikrofasetan banatua dagoela iradokiaz (**VI.7a. Irudia**). Poliuretanoetan ematen den mikrofase banaketa maila hainbat faktoreen menpekoa da, aipatzearren, poliuretanoaren konposizio kimikoa eta segmentu zurrun edo malguaren edukia (Koberstein eta Russell, 1986; Velankar eta Cooper, 1998; Saiani et al., 2001; Garrett et al., 2003; Fernández-d'Arlas et al., 2008). Mikrofaseen beira trantsizioa fase puruekiko alderatuz, fase banaketa mailaren ideia

bat eduki daiteke (Rueda-Larraz et al., 2009). Aurretik, UPU-ren sintesian erabili den PTMEG poliol puruarentzat $-81,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tako beira trantsizio tenperatura neurtu zen (Ugarte et al., 2014), eta atal honetan sintetizaturiko poliuretanoaren fase malguarentzat lortutako beira trantsizio tenperatura handiagoa da ($-63,7\text{ }^{\circ}\text{C}$), $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inguruko aldearekin (**VI.7b. Irudia**). Honek, poliuretanoaren segmentu zurrunk segmentu malguaren mugikortasuna eragozten dutela edo fase malguan segmentu zurrunk frakzio bat disolbaturik aurkitzen dela iradokitzen du.

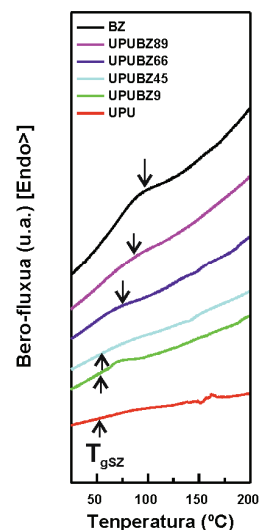
a)



b)



d)



VI.7. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite sistema ezberdinen DSC termogramak: a) -80 - $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenperatura tartean, b) -80 eta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenperatura tartean eta d) 25 - $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenperatura tartean.

BZ puruarentzat, 100 °C inguruan entalpia bat ageri da, galdutako urari atxiki dakiokiena (Barud et al., 2007). Nanokonpositeei dagokionean, temperatura baxuetan T_{gSM} arinki handitu egiten da, eta honek BZ-rekin elkarrekintzak ematen direla iradokitzen du (Cao et al., 2007; Gao et al., 2012; Hormaiztegui et al. 2016). Temperatura altuagotan BZ puruan ikusi den uraren galerari atxiki dakokeen entalpia temperatura baxuagoetara desplazatzen dela ikus daiteke UPU edukia handitzean. Aldiz, nanokonpositeetan segmentu zurrunean aberatsa den uraren galerari atxiki dakiokien fasearen trantsizioa temperatura altuagoetara desplazatzen da BZ edukia handitzean, BZ-ak eragin dezakeen mugimendu eragozpena medio (**VI.7d. Irudia**).

Azterketa termograbitmetrikoa

UPU, BZ eta beraien nanokonpositeen egonkortasun termikoaren azterketa analisi termograbitmetrikoz burutu da. **VI.8. Irudian**, 25 °C-tatik 800 °C-tara eta nitrogeno giroan lorturiko TGA/DTGA kurbak aurkezten dira. TGA kurbetan, DSC termogrametan ere ikusi den bezala, lagin guztiek xurgaturiko uraren lurruntzearekin erlazionatzen den masa galera bat aurkezten dute 100 °C inguruan BZ-ren edukiarekiko menpekoa izanik. Masa galera balioetatik laginen hezetasun-edukia kalkulatu da, eta balioak **VI.3. Taulan** aurkezten dira.

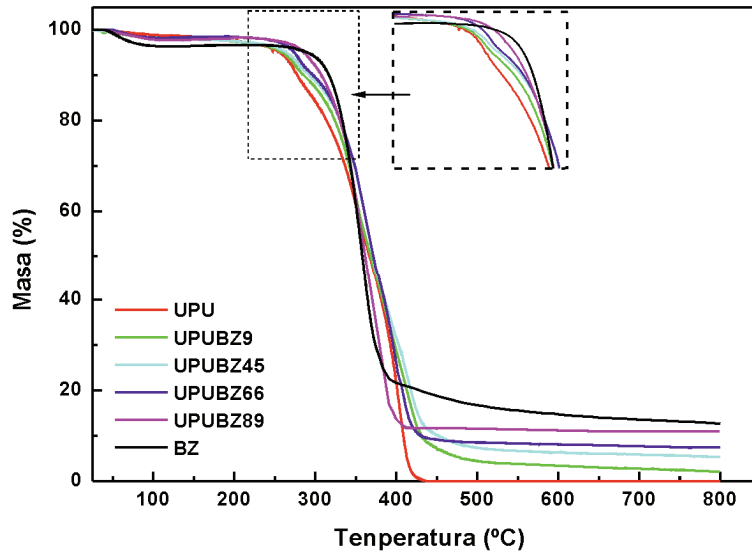
VI.3. Taula. BZ eta UPU film puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen TGA eta DTGA kurbetatik lorturiko hezetasun-edukia, hasierako degradazio temperatura, erraitsu portzentaia 700 °C-tan eta kalkulaturiko BZ edukia.

Sistema	Hezetasuna (%)	T_0 (°C)	Erraitsu (%)	BZ edukia (%)
UPU	1,1	273	0,0	-
UPUBZ9	1,5	276	2,0	15,0
UPUBZ45	1,8	280	5,8	43,0
UPUBZ66	1,6	280	8,2	60,1
UPUBZ89	2,2	366	11,0	81,5
BZ	4,0	359	13,5	-

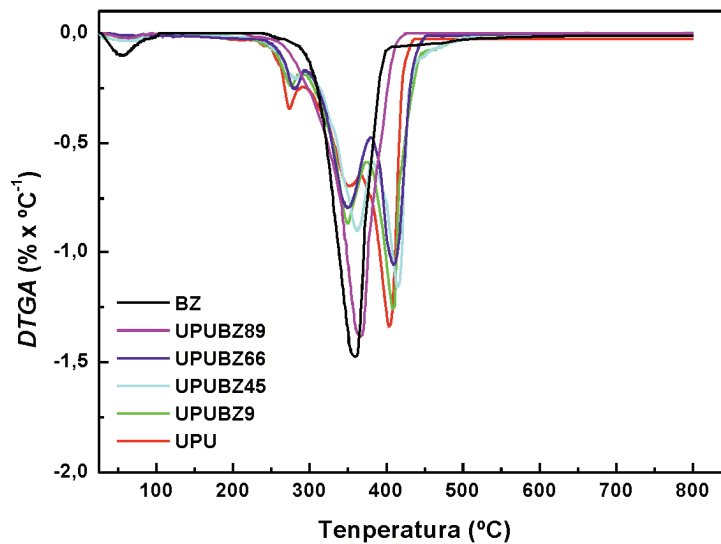
Ikus daitekeenez, zelulosaren izaera hidrofilikoen ondorioz, BZ filmak hezetasun handiena erakusten du. Nanokonpositeei dagokionez, hezetasun edukia txikitu egiten da UPU osagai hidrofobikoaren gehikuntzarekin, BZ filmarekin alderatuz, ia %50-eko murrizketa bat ikusi delarik. Temperatura altuagoetan, BZ eta UPU filmak degradazio

patroi ezberdina aurkezten dute. BZ filmak, nitrogeno giroan lorturiko zelulosaren degradazio termiko profil tipikoa erakusten du, non 250-400 °C tenperatura tartean ematen den masa galera, lotura glikosidikoen degradazioari eta ondorengo degradazio termikoan sortzen diren errauts hondakinekin erlaziona daitekeen, %13,5 izanik 700 °C-tan (Lee et al., 2012).

(a)



(b)



VI.8. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen:

a) TGA eta b) DTGA termogramak.

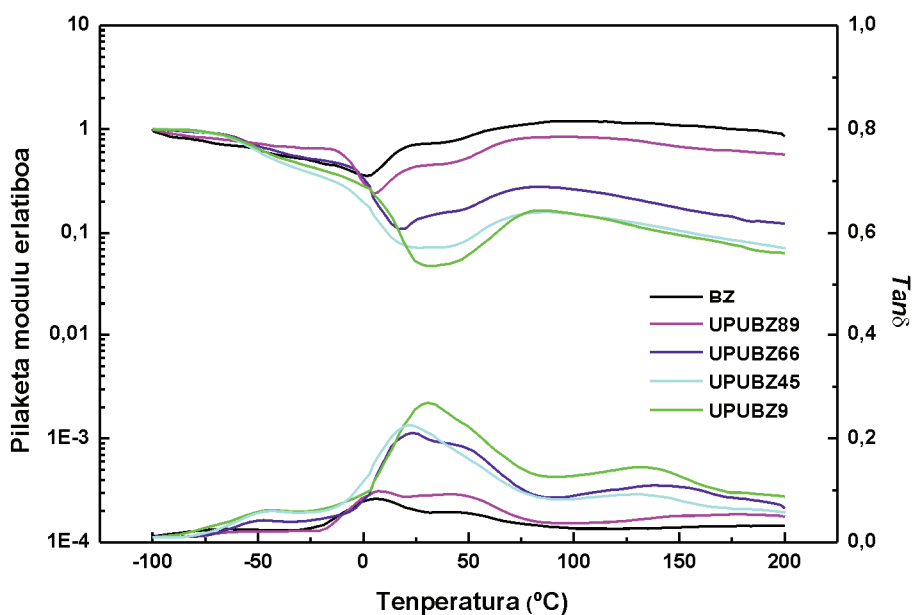
UPU filmari dagokionez, degradazio mekanismoa konplexuagoa da, segmentu malgu eta zurrunen egonkortasun ezberdinak medio, hainbat degradazio urratsetan ematen delarik (Lee et al., 2007; Chattopadhyay eta Webster, 2009; García-Pacios et al., 2011). Izan ere, 250-365 °C temperatura tartean bi masa galera ikus daitezke, segmentu zurrunaren disoziazioarekin erlazonatuak, isozianatoak, alkohola, amina eta CO₂ sortzeko (Petrovic et al., 2007; Fang et al., 2014; Wu eta Luo, 2016). Azken degradazio urratsa, 365-440 °C temperatura tartean, poliuretanoaren segmentu malguarekin erlazonatzen da (Gurunathan eta Chung, 2016). Honez gain, 700 °C-tan, UPU-ak, nitrogenotan, ez du kontuan izateko erraunts hondakinik aurkezten.

Nanokonpositeen *TGA/DTGA* kurbei dagokionean, BZ eta UPU osagai puruentzat ikusi diren degradazio urratsa berak antzeman daitezke. Hala ere, beraien artean ezberdintasunak ikus daitezke. Horrela, UPUBZ89 nanokonpositearentzat lorturiko *TGA* eta *DTGA* kurbak, BZ-rentzat lorturikoen oso antzekoak dira, eta aldiz UPUBZ9 nanokonpositearentzat lorturikoak UPU-aren antzeko degradazio termiko profila erakusten dute. Tarteko konposizioetan (UPUBZ45 eta UPUBZ66), BZ eta UPU osagaien edukiaren arabera, degradazio pikuen intentsitatean ezberdintasunak bereiz daitezke, baita ere degradazio temperatura maximoaren balioan. Hasierako degradazio temperaturari, T_0 , dagokionean, zeinetan %5-eko masa galerari dagokion (**VI.3. Taula**), handitu egiten da BZ edukia handitzen den heinean, eta hau zelulosaren egonkortasun termiko handiagoari atxiki dakiok. Erraunts edukiari dagokionean, 700 °C-tan (**VI.3. Taula**), handitu egiten da BZ edukia handitzean. UPU filmak hondakinik ez duela aurkezten kontutan izanik, balio hau nanokonpositeen BZ edukia kalkulatzeko erabili daiteke. Balio hauek, **VI.3.Taulan** laburbiltzen dira eta hurbilketa nahiko ona erakusten dute, aurretik esperimentalki masa diferentziaz kalkulaturikoekin.

Azterketa mekaniko-dinamikoa

UPUBZ nanokonpositeen eta BZ puruaren portaera dinamiko-mekanikoa *DMA*-z aztertu da. Pilaketa modulu erlatiboaren (E'_R) eta galera-faktorearen bilakaera ($Tan\delta$) temperaturaren funtziopean **VI.9. Irudian** aurkezten dira. Aurretik, V. atalean ikusi bezala BZ film puruak pilaketa moduluaren erorketa eta galera-faktorean maximo bat aurkezten du -25 eta 25 °C temperatura tartean, plastifikatzaile gisa jokatzen duen ur molekulen askatzeari atxiki dakiokelarik (Figueiredo et al., 2013). Temperatura altuagotan, pilaketa modulu erlatiboaren igoera ikus daiteke, BZ-k berezkoa duen zurruntasuna errekuperatuz. BZ eduki altuko nanokonpositeak, UPUBZ89 hain zuzen, BZ-ren antzeko portaera aurkezten du. Aldiz, UPU eduki handiagoko nanokonpositeetan, hainbat erlaxazio ikus daitezke. Nanokonpositeek, -50 eta -30 °C-

tako temperatura tartean, pilaketa modulu erlatiboaren erorketa eta galera-faktorearen maximo bat aurkezten dute, eta DSC-ko emaitzekin alderatuz, erlaxazio hau UPU-aren segmentu malguan aberatsa den fasearen beira trantsizioari atxiki dakioke (Hormaztegui et al., 2016). Hortaz, $Tan\delta$ pikuaeren intentsitatea handitu egiten da, UPU edukia handitzean. Temperatura altuagoan, 0 eta 75 °C temperatura tartean, pilaketa moduluaren bigarren erorketa bat eta galera faktorearen beste maximo bat ikus daiteke, non bai erorketa eta bai maximoa gehiago nabarmentzen diren nanokonpositean UPU edukia handitzen den heinean. Erlaxazio hau, BZ-n ikusi bezala uraren galerari eta segmentu zurrunean (IPDI-PD-DMPA) aberatsa den faseari legoke. Azkenik, BZ-ren zurruntasunaren berreskuratzea dela eta, pilaketa modulu erlatiboan ematen den errekupeazio ostean, 75 °C-tatik aurrera beste erorketa bat eta galera faktorearen beste maximo bat ikus daiteke, UPU-aren fluxuari atxiki dakiokena.

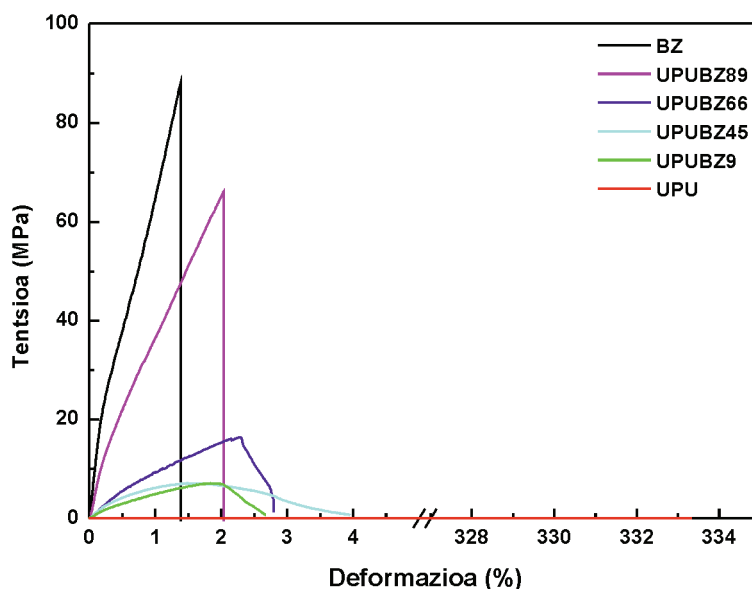


VI.9. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta nanokonposite sistema ezberdinen pilaketa modulu erlatiboa (E_R) eta galera-faktorearen ($Tan\delta$) bilakaera temperaturaren aurrean.

VI.3.4. Portaera mekanikoa

BZ, UPU eta beraien UPUBZ nanokonpositeen portaera mekanikoa trakzio saiakuntza bidez aztertu da. **VI.10. Irudian**, tentsio-deformazio kurbak azaltzen dira eta lorturiko, tentsio erresistentzia, modulu elastikoa eta haustura deformazioak berriz, **VI.11. Irudian** aurkezten dira. UPU filmak, portaera elastomerikoa aurkezten du, deformazio altu eta elastikotasun modulu eta tentsio erresistentzia balio baxuekin.

Portaera hau bat dator beste autore batzuek ikusi dutenarekin (Santamaria-Echart et al., 2016). Aldiz BZ filmak portaera guztiz ezberdina aurkezten du. Portaera hauskorra erakusten du, modulu altua eta haustura deformazioa baxuarekin, eta hau, planoan orientaturiko zelulosa nanozuntzek osatzen duten nanoeskalako 3D-ko egitura uniforme eta jarraiari atxiki dakioke (Nakagaito et al., 2005).

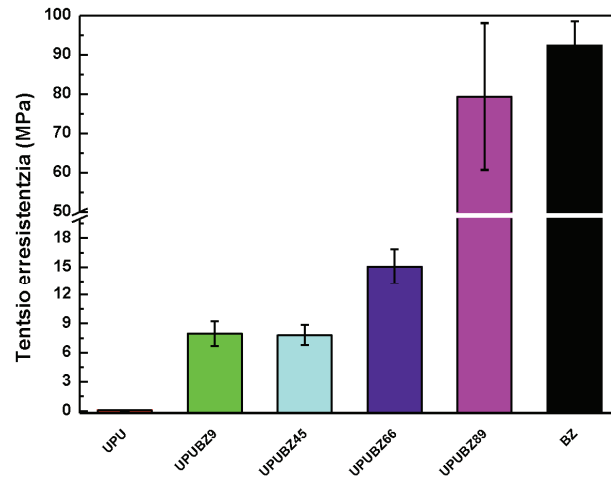


VI.10. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen tentsio-deformazio kurbak.

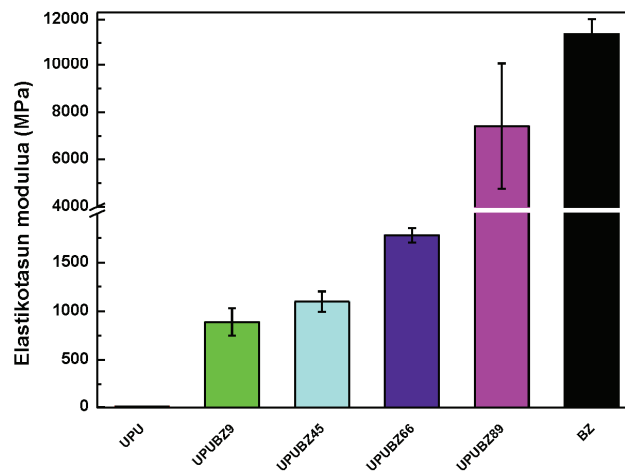
UPUBZ nanokonpositeetan, bai tentsio zein elastikotasun moduluan hobekuntzak antzematen dira BZ edukiarekin, UPU puruarekin alderatuz 100 eta 400 aldiz handiagoa izanik, UPUBZ89 nanokonpositean, hurrenez hurren. Beste autore batzuek ere, BZ-an oinarrituriko nanokonpositeetan, hobekuntzak ikusi zituzten, eta hauen arabera, efektu hau BZ nanozuntzen errefortzu efektuari atxiki dakioke (Yano et al., 2005; Retegi et al., 2012). BZ filmaren tentsio-deformazio makurra kontutan hartuz, UPUBZ nanokonpositeetan, BZ osagaia dela eta, haustura deformazioa txikitu egiten dela ikus daiteke. Hala ere, nanokonpositeen artean zenbait ezberdintasun antzeman daitezke. UPUBZ89 nanokonpositeak, portaera hauskorra erakusten du. Aldiz, UPU edukia handitzen den heinean (UPUBZ66 eta UPUBZ45), tentsio-deformazio kurbetan ikusi legez (**VI.10. Irudia**), nanokonpositeek haustura deformazio balio arinki altuagoak aurkezten dituzte. Duktilitatea handitzen dela esan daiteke, non tentsio maximoa ondoren, etendura guztiz ematen den arte tentsioa gradualki txikitzen den. Portaera honen arrazoia, BZ-ren 3D-ko egitura zehar UPU-aren barneratze efektiboa izan daiteke, nanozuntzen artean tentsio transferentzia ahalbidetzen dutelarik eta aldi

berean, laginen hondamenezko haustura eragin dezaketen pitzaduren hedapena saihestuz (Retegi et al., 2012).

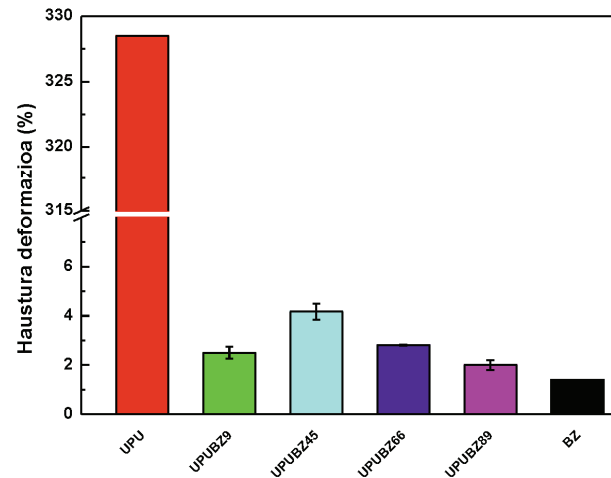
(a)



(b)



(d)



VI.11. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen: a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak.

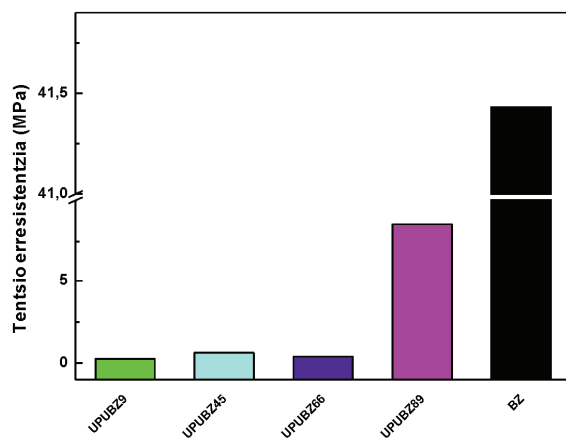
Portaera mekanikoa hezean

Hainbat ikerketek, zelulosa indargarri bezala erabiltzean konposatuek uraren eraginez azaltzen duten portaera mekanikoa kaltetu daitekeela ondorioztatu dute, zuntzen puztearen ondorioz (Dhakal et al., 2007; Alamri eta Low, 2012; Muñoz eta García-Manrique, 2015). Horregatik, BZ puruaren zein nanokonpositeen propietate mekanikoetan ur-xurgapenak izan dezakeen eragina aztertu da. Lagin bakoitzaren probeta bat, uretan murgildu ondoren lorturiko propietate mekanikoak **VI.12. Irudian** azaltzen dira. BZ lehorraren propietateekin aldentuz (**VI.11.Irudia**), haustura tentsio erresistentzia, 92,34 MPa-tik 41,43 MPa-etara txikitzen da eta haustura deformazioa %1,39-tik %3,76-tara handitzen da.

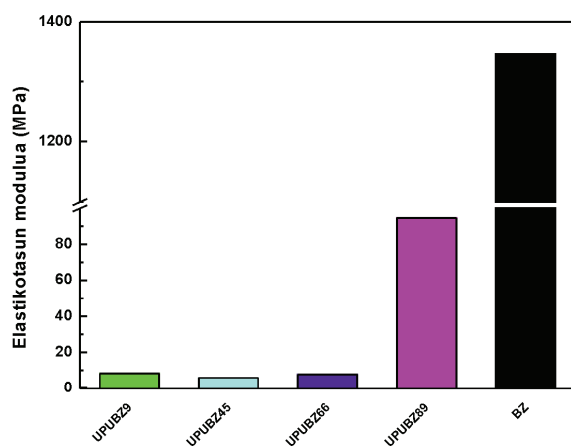
Nanokonpositeen kasuan, BZ-rekin gertatzen den bezala, nahiz eta deformazioa handitu, trakzio erresistentzia eta baita elastikotasun modulua txikitu egiten dira, eta geroz eta txikiagoak dira UPU edukia handitzen den heinean. Emaiza hau, BZ kantitatearekin erlazionatu daiteke, jakina den bezala urarekiko osagai sentikorra baita. Erabilitako ur-bolumen eduki handiak nanozuntzen puztea dakar. Puzturiko nanozuntzetan urak, plastifikatzaile bezala jokatu dezake deformazioa hobetuz eta arrazoi hori dela eta, deformazio handiagoak eta erresistentzia eta modulu txikiagoak ikusi dira zelulosa eduki handiekin. Beste autore batzuek, ur-xurgapenarekin antzeko tendentziak ikusi dituzte zuntzetan oinarritutako polimero konposatuetan (Dhakal et al., 2007; Alhuthali eta Low, 2013; Huner, 2015).

Era berean, ur-atxikipenaren ondorioz deformagarritasun balio hau ikusirik, urak eragindako materialen aurretiazko itxura-oroimen propietatea ikertu izan nahi da. Horretarako, UPUBZ66 lagina uretan murgildu eta jarraian tolestu da (**VI.13a. Irudia**). Tolesturiko lagina, 40 °C-tan lehortu da itxura finkatzeko (**VI.13b. Irudia**). Jarraian, uretan murgildu da. UPUBZ66 nanokonpositearen itxura-oroimen ahalmena, **VI.13d. eta VI.13e. Irudietan** laginaren itxura eboluzioa jarraituz aztertu da. Irudiak, UPUBZ66 nanokonpositearen aurretiazko itxura berreskuratzearen portaera baieztatzen du. Bertan ikus daitekeenez, aurretik lehorturiko materiala (**VI.13b. Irudia**) minutu batzuetan ur desionizatuan murgilduta (**VI.13d. eta VI.13e. Irudia**), aurreko egitura bera ia berreskuratzekeo gai da (**VI.13f. Irudia**). Saiakera honetan begibistatu den itxura-oroimenaren ahalmena interesgarria izan daiteke hainbat aplikazioetarako, zeintzuetan ura propietateak aldatzeko estimuluan bilakatzen den.

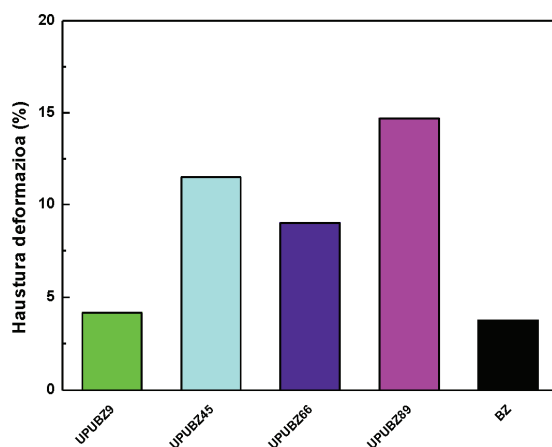
(a)



(b)

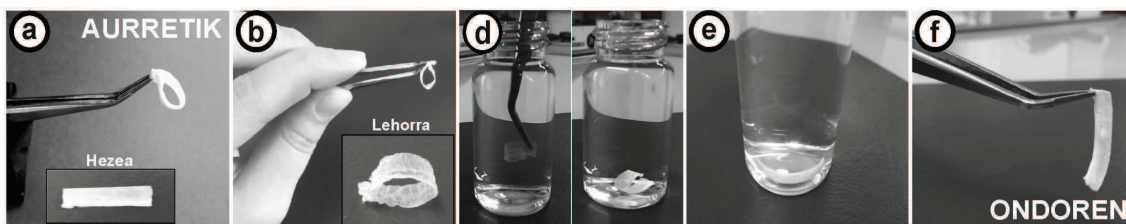


(d)



VI.12. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen:

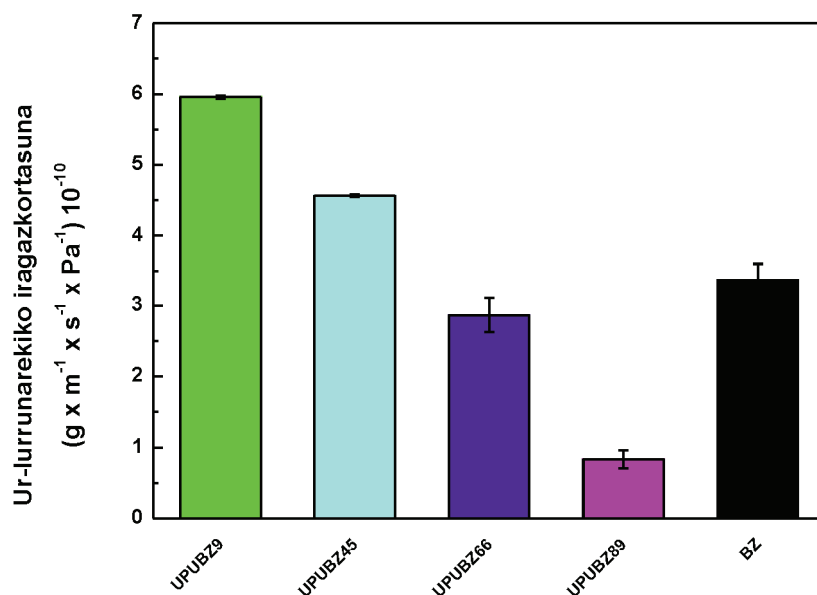
a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak hezean.



VI.13. Irudia. a) Uretan murgilduriko UPUBZ66 laginak tolestu ondoren aurkezten duen itxura, b) tolesturiko lagin lehorraren itxura, d) eta e) laginaren itxura eboluzioa uretan eta f) laginak berreskuratzen duen itxura.

VI.3.5. Iragazkortasun azterketa

Hainbat aplikazioetarako funtsezkoa da nanokonpositeen zehar ur-lurrunarekiko iragazkortasuna aztertzea. **VI.14. Irudian**, BZ film puruaren eta UPUBZ nanokonpositeen ur-lurrunarekiko iragazkortasun balioak aurkezten dira.



VI.14. Irudia. BZ osagai puruaren eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen ur-lurrunarekiko iragazkortasuna.

Bibliografian, uretan oinarritutako poliuretano ezberdinentzat ur-lurrunarekiko iragazkortasun balioak, $4-9 \times 10^{-10} (g \times m^{-1} \times Pa^{-1} \times s^{-1})$ tartean aurkitzen dira (Kwak et al., 2003; Rahman et al., 2008). Ikus daitekeenez, nanokonpositeen iragazkortasun balioek hobekuntza nabarmena aurkezten dute, BZ presentziari atxiki daitekeelarik. Izan ere, iragazkortasuna txikitu egiten da zelulosa kantitatea handitzen doan heinean. Azpimarratzekoa da, BZ eduki handiko nanokonpositearen kasuan, ur-lurrunarekiko balioa BZ-rena baino txikiagoa dela, batez ere zelulosa edukia %89-koa denean.

Baliteke emaitza hau, BZ-ren berezko izaera hidrofilikoarekin erlazionatuta egotea (Liu et al., 2014), zeren xurgaturiko ur-lurrun molekulak harrapaturik gelditu daitezke. Lorturiko emaitzak bat datoz *KA*, *UXR* eta hezean lorturiko propietate mekanikoekin (VI.3.1 eta VI.3.4 sekzioetan).

VI.4. ONDORIOAK

Atal honetan, jatorri berriztagarritik eratorritako BZ eduki ezberdinak dituzten poliuretano nanokonpositeak prestatu dira *ex-situ* edo inpregnazio teknikaren bidez, azken hauen propietateak hobetzeko asmoz. Gardentasun azterketari dagokionean, transmitantzia balio altuak ikusi dira, UPU filmaren jatorrizko gardentasunarekin erlazionatua dagoelarik. Beraz, nanokonpositeen opakotasun balioan murrizketa nabarmena pairatu da UPU edukia handitzen doan heinean. Nanokonpositeen *FTIR-ATR* espektroetan, bi osagaien absortzio banda esanguratsuenak azaltzen direla ikusirik, UPUBZ nanokonpositeak eratu direla baieztatu daiteke. *SEM* teknikaren bidez, BZ nanozuntzak poliuretano matrize polimerikoarekin estaliak aurkitzen direla ondorioztatu da egitura trinkoagoa osatuz. Hori dela eta, poliuretanoaren izaera hidrofoboari esker honen edukia handitzean *KA*-ren balioa handitzen da eta ur-xurgapen balioak txikitzen da eta BZ-ren berezko 3D egituraren ondorioz, nanokonpositeetan egonkortasun termikoa eta propietate mekanikoetan hobekuntza nabarmena da, UPU film puruarekin konparatuz. *DSC* termograman, temperatura baxuetan segmentu malguarekin erlazionaturik dagoen T_{gSM} trantsizioa temperatura altuagotara desplazatzen dira. Honen arrazoia, UPU eta BZ-ren arteko interakzioei atxiki dakiokete. Honez gain, BZ eduki altuko nanokonpositeen termogrametan, 100 °C inguruan BZ puruaren ur-lurrunarekin erlazionaturik dagoen piko endotermiko zabal bat ikus daiteke. Nanokonpositeen *DMA* analisisian, hiru trantsizio antzeman daitezke. Lehenengoa (-50 eta -30 °C tartean), UPU-aren segmentu malguan aberatsa den faseari atxiki dakiokete, bigarrena (0 eta 75 °C tartean), xurgaturiko urari eta segmentu zurrunean (IPDI-PD-DMPA) aberatsa den faseari dakiokete eta temperatura altuagotan agertzen dena UPU-aren fluxuari atxiki dakioketeena. Emaitza hauek *DSC*-ko emaitzekin bat datoz. BZ filma poliuretano matrizean gehitzeak, *ULI* balioetan izugarritzko eragina du, hauek gutxituaz eta portaera honen arrazoia zelulosak ur-lurrun molekulak xurgatu eta harrapatzen dituela izan daiteke, masan %89-ko edukian batez ere. Gainera, UPUBZ66 nanokonpositea uretan murgiltzearen ondorioz, deformazio hobetuak lortu dira eta honez gain, aurretiazko itxura-oroimen propietatea konprobatu da. Lorturiko material nanokonposite berrien propietate hobetuei esker aplikazio potentzial handiak izan ditzazkete.

VI.5. BIBLIOGRAFIA

- Alamri, H., Low, I. M. (2012). *Mechanical properties and water absorption behaviour of recycled cellulose fibre reinforced epoxy composites*. Polymer Testing, 31, 620-628.
- Alhuthali, A. M., Low, I. M. (2013). *Mechanical properties of cellulose fibre reinforced vinyl-ester composites in wet conditions*. Journal of Materials Science, 48, 6331-6340.
- ASTM, 2004, D6866 (2004). *Standard test method for determining the biobased content of natural range materials using radiocarbon and isotope ratio mass spectrometry analysis*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM, 2005, D4274 (2005). *Standard test methods for testing polyurethane raw materials: determination of hydroxyl numbers of polyols*. Annual Book of ASTM Standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Barud, H. S., Ribeiro, C. A., Crespi, M. S., Martines, M. A. U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R. F. C., Messaddeq, Y., Ribeiro, S. J. L. (2007). *Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 87, 815-818.
- Bullermann, J., Friebel, S., Salthammer, T., Spohnholz, R. (2013). *Novel polyurethane dispersions based on renewable raw materials-stability studies by variations of DMPA content and degree of neutralisation*. Progress in Organic Coating, 76, 609-615.
- Cao, X., Dong, H., Li, C. M. (2007). *New nanocomposite materials reinforced with flax cellulose nanocrystals in waterborne polyurethane*. Biomacromolecules, 8, 899-904.
- Chattopadhyay, D. K., Webster, D. C. (2009). *Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes*. Progress in Polymer Science, 34, 1068-1133.
- Dhokal, H. N., Zhang, Z. Y., Richardson, M. O. W. (2007). *Effect of water absorption on the mechanical properties of hemp fibre reinforced unsaturated polyester composites*. Composites Science and Technology, 67, 1674-1683.
- Fang, C., Zhou, X., Yu, Q., Liu, S., Guo, D., Yu, R., Hu, J. (2014). *Synthesis and characterization of low crystalline waterborne polyurethane for potential application in water-based ink binder*. Progress in Organic Coatings, 77, 61-71.
- Fernández-d'Arlas, B., Rueda, L., de la Caba, K., Mondragon, I., Eceiza, A. (2008). *Microdomain composition and properties differences of biodegradable polyurethanes based on MDI and HDI*. Polymer Engineering and Science, 48, 519-529.
- Figueiredo, A. G. P. R., Figueiredo, A. R. P., Alonso-Varona, A., Fernandes, S. C. M., Palomares, T., Rubio-Azpeitia, E., Barros-Timmons, A., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Freire, C. S. R. (2013). *Biocompatible bacterial cellulose-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposites films*. BioMed Research International, 2013, Article ID 698141.
- Floros, M., Hojabri, L., Abraham, E., Jose, J., Thomas, S., Pothan, L., Leao, A. L., Narine, S. (2012). *Enhancement of thermal stability, strength and extensibility of lipid-based polyurethanes with cellulose-based nanofibers*. Polymer Degradation and Stability, 97, 1970-1978.
- Gao, Z., Peng, J., Zhong, T., Sun, J., Wang, X., Yue, C. (2012). *Biocompatible elastomer of waterborne polyurethane based on castor oil and polyethylene glycol with cellulose nanocrystals*. Carbohydrate Polymers, 87, 2068-2075.
- García-Pacios, V., Iwata, Y., Colera, M., Martín-Martínez, J. M. (2011). *Influence of the solids content on the properties of waterborne polyurethane dispersions obtained with polycarbonate of hexanediol*. International Journal of Adhesion and Adhesives, 31, 787-794.

- Garrett, J. T., Xu, R., Cho, J., Runt, J. (2003). *Phase separation of diamine chain-extended poly(urethane) copolymers: FTIR spectroscopy and phase transitions*. *Polymer*, 44, 2711-2719.
- Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., Troncoso, O. P., Canet-Ferrer, J., Martínez- Pastor, J. (2009). *Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites*. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1098-1104.
- Gurunathan, T., Chung, J. S. (2016). *Physicochemical properties of amino-silane-terminated vegetable oil-based waterborne polyurethane nanocomposites*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4, 4645-4653.
- Hormaiztegui, M. E. V., Mucci, V. L., Santamaria-Echart, A., Corcuera, M. A., Eceiza, A., Aranguren, M. I. (2016). *Waterborne polyurethane nanocomposites based on vegetable oil and microfibrillated cellulose*. *Journal of Applied Polymer Science*, 133 44207.
- Huner, U. (2015). *Effect of water absorption on the mechanical properties of flax fiber reinforced epoxy composites*. *Advances in Science and Technology Research Journal*, 9, 1-6.
- Kim, B. K. (1996). *Aqueous polyurethane dispersions*. *Colloid and Polymer Science*, 274, 599-611.
- Koberstein, J. T., Russell, T. P. (1986). *Simultaneous SAXS-DSC study of multiple endothermic behaviour in polyether-based polyurethane block copolymers*. *Macromolecules*, 19, 714-720.
- Kwak, Y. S., Park, S. W., Lee, Y. H., Kim, H. D. (2003). *Preparation and properties of waterborne polyurethanes for water-vapor-permeable coating materials*. *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 123-129.
- Lee, M. H., Choi, H. Y., Jeong, K. Y., Lee, J. W., Hwang, T.W., Kim, B.K. (2007). *High performance UV cured polyurethane dispersion*. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 1677-1681.
- Lee, K. Y., Tammelin, T., Schulfter, K., Kiiskinen, H., Samela, J., Bismarck, A. (2012). *High performance cellulose nanocomposites: comparing the reinforcing ability of bacterial cellulose and nanofibrillated cellulose*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4, 4078-4086.
- Liu, Y., Wang, H., Yu, G., Yu, Q., Li, B., Mu, X. (2014). *A novel approach for the preparation of nanocrystalline cellulose by using phosphotungstic acid*. *Carbohydrate Polymers*, 110, 415-422.
- Mequanint, K., Sanderson, R. (2006). *Hydrolytic stability of nano-particle polyurethane dispersions: implications to their long-term use*. *European Polymer Journal*, 42, 1145- 1153.
- Muñoz, E., García-Manrique, J. A. (2015). *Water absorption behaviour and its effect on the mechanical properties of flax fibre reinforced bioepoxy composites*. *International Journal of Polymer Science*, 2015, Article ID 390275.
- Nakagaito, A. N., Iwamoto, S., Yano, H. (2005). *Bacterial cellulose: the ultimate nanoscalar cellulose morphology for the production of high-strength composites*. *Applied Physics A*, 80, 93-97.
- Nelson, M. L., O'Connor, R. T. (1964). *Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II*. *Applied Polymer Science*, 8, 1325-1341.
- Pereira, I. M., Orefice, R. L. (2011). *Study of the morphology exhibited by linear segmented polyurethanes*. *Macromolecular Symposia*, 299, 190-198.
- Petrovic, Z. S., Yang, L., Zlatanc, A., Zhang, W., Javni, I. (2007). *Network structure and properties of polyurethanes from soybean oil*. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 2717-2727.
- Pinto, E. R. P., Barud, H. S., Polito, W. L., Ribeiro, S. J. L., Messaddeq, Y. (2013). *Preparation and characterization of the bacterial cellulose/polyurethane nanocomposites*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 114, 549-555.

- Pinto, E. R. P., Barud, H. S., Silva, R. R., Palmieri, M., Polito, W. L., Calil, V. L., Cremona, M., Ribeiro, S. J. L., Messaddeq, Y. (2015). *Transparent composite prepared from bacterial cellulose and castor oil based polyurethane as subtracted for flexible OLEDs*. Journal of Materials Chemistry C, 3, 11581-11588.
- Rahman, M. M., Kim, H. D., Lee, W. K. (2008). *Preparation and characterization of waterborne polyurethane/clay nanocomposite: effect on water vapor permeability*. Journal of Applied Polymer Science, 110, 3697-3705.
- Retegi, A., Algar, I., Martin, L., Altuna, F., Stefani, P., Zuluaga, R., Gañan, P., Mondragon, I. (2012). *Sustainable optically transparent composites base on epoxidized soy-bean oil (ESO) matrix and high contents of bacterial cellulose (BC)*. Cellulose, 19, 103-109.
- Rueda-Larraz, L., Fernández d'Arlas, B., Tercjak, A., Ribes, A., Mondragon, I., Eceiza, A. (2009). *Synthesis and microstructure-mechanical property relationships of segmented polyurethanes based on a PCL-PTHF-PCL block copolymer as soft segment*. European Polymer Journal, 45, 2096-2109.
- Saiani, A., Daunch, W. A., Verbeke, H., Leenslag, J. W., Higgins, J. S. (2001). *Origin of multiple melting endotherms in a high hard block content polyurethane. 1. Thermodynamic investigation*. Macromolecules, 34, 9059-9068.
- Santamaria-Echart, A., Arbelaiz, A., Saralegi, A., Fernández-d'Arlas, B., Eceiza, A., Corcuera, M. A. (2015). *Relationship between reagents molar ratio and dispersion stability and film properties of waterborne polyurethanes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 482, 554-561.
- Santamaria-Echart, A., Ugarte, L., García-Astrain, C., Arbelaiz, A., Corcuera, M. A., Eceiza, A. (2016). *Cellulose nanocrystals reinforced environmentally-friendly waterborne polyurethane nanocomposites*. Carbohydrate Polymers, 151, 1203-1209.
- Saska, S., Teixeira, L. N., De Oliveira, P. T., Gaspar, A. M. M., Ribeiro, S. J. L., Messaddeq, Y., Marchetto, R. (2012). *Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering*. Journal of Materials Chemistry, 22, 22102-22112.
- Ugarte, L., Fernandez-d'Arlas, B., Valea, A., Gonzalez, M. L., Corcuera, M. A., Eceiza A. (2014). *Morphology-properties relationship in high-renewable content polyurethanes*. Polymer Engineering and Science, 54, 2282-2291.
- Urbina, L., Algar, I., García-Astrain, C., Gabilondo, N., Gonzalez, A., Corcuera, M.A., Eceiza, A., Retegi, A. (2016). *Biodegradable composites with improved barrier properties and transparency from the impregnation of PLA to bacterial cellulose membranes*. Journal of Applied Polymer Science, 133, 43669.
- Velankar, S., Cooper, S. L. (1998). *Microphase separation and rheological properties of polyurethane melts. 1. Effect of block length*. Macromolecules, 31, 9181-9192.
- Wu, G., Li, J., Luo, Y. (2016). *Flame retardancy and thermal degradation mechanism of a novel post-chain extension flame retardant waterborne polyurethane*. Polymer Degradation and Stability, 123, 36-46.
- Yamamoto, H., Fumitaka, H. (1994). *In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I_α and I_β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) 13 C NMR spectroscopy*. Cellulose, 1, 57-66.
- Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. (1996). *In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I_α and I_β at the early stage of incubation*. Cellulose, 3, 229-242.
- Yano, H., Sugiyama, J., Nakagaito, A. N., Nogi, M., Matsuura, T., Hikita, M., Handa, K. (2005). *Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers*. Advanced Materials, 17, 153-155.

VII. Atala

**ONDORIO OROKORRAK, ETORKIZUNERAKO LAN-
ILDOAK ETA ARGITALPENAK**

VII. ONDORIO OROKORRAK, ETORKIZUNERAKO LAN-ILDOAK ETA ARGITALPENAK

Atal honetan, lan honetatik lortutako ondorio orokorrak aurkezten dira eta lanari jarraipena emateko etorkizunerako lan-ildo batzuk proposatzen dira.

VII.1. ONDORIO OROKORRAK

Bakterio-zelulosaren biosintesia

- Hartzidura-ingurune (ez-ohikoa eta estandarra) eta baldintza ezberdinak (estatikoa eta dinamikoa) erabiliz morfologia ezberdinetako bakterio-zelulosa (mintza eta esfera itxura) ekoiztu da.
- Ez-ohiko ingurunean lorturiko etekinak, ingurune estandarrekin aldentuz altuagoak izan dira.
- *FITR-ATR* eta *NMR* azterketa fisiko-kimikoari dagokionez, erabilitako edozein baldintzetan, ez-ohiko ingurunean sintetizaturiko BZ-ren ezaugarriak, estandarrean lorturikoaren antzekoak izan dira.
- Baldintza dinamikoan, kristaltasun indizea, *PM* eta etekin txikiagoak lortu dira, baina egitura porotsuagoa aurkezten dute eta hortaz, ura xurgatzeko gaitasun handiagoa.
- Epe motzeko zitotoxikotasun saiakeran, BZ-mintzak toxikotasun eza aurkeztu du.
- Orokorrean, ez-ohiko inguruneak, hots, pinaburu hondakinetatik eratorritakoan, morfologia ezberdinetako zelulosa produzitzeko aukera aurkezten du, beraz, berriztagarria izateaz gain kostu baxuko hondakinak erabiliz, balio altuko produktua lortzen da eta hainbat aplikazioetan aukera paregabea emanez.

Bakterio-zelulosa eta montmorillonita bionanokonpositeak

- Atal honetan, BZMMT bionanokonposite hibridoak prestatu dira *in-situ* teknikaren bidez hartzidura-ingurunera MMT dispertsio ezberdinak (masan %0,5, 1 eta 2) gehituz. BZ-ren biosintesian zehar etekin txikiagoa lortzen dela ikusi da eta ondorioz, hartzidura-ingurunean MMT-aren presentziak zelulosaren biosintesian eragina izan duela aztertu da.
- Lortutako BZMMT bionanokonposite hibridoan MMT edukia, masa espektrometroarekin eta azterketa termograbitmetrikoa erabiliz kuantifikatu da,

masan %7, 9 eta 13 MMT kontzentrazioak dituzten bionanokonpositeak lortu direlarik.

- Honez gain, *SEM*-z aztertu den bezala, ingurunean MMT-aren gehikuntzaren ondorioz egitura trinkoagoak lortu dira, BZMMT bionanokonposite hibridoan bai porotasuna zein gardentasuna txikituz, aldiz MMT nanobuztinen izaera hidrofobikoari esker *UAG* balio handiagoak lortzen dira.
- *XRD* bidez MMT-aren interkalazio/esfoliazio maila altua lortu dela baieztatzen da eta ondorioz, portaera termiko eta iragazkortasun propietateetan hobekuntza igarri da.
- Gainera, bai BZ zein BZMMT bionanokonpositeak lurpean murgildurik biodegradagarriak direla konprobatu da.

Bakterio-zelulosa, montmorillonita eta almidoi termoplastikozko bionanokonpositeak

- Atal honetan, *ex-situ* edo inpregnazio teknikaren bitartez BZ eta BZMMT mintzak almidoiarekin inpregnatuz, BZ eta BZMMT eduki altuko (%25-68) ATPBZ eta ATPBZMMT bionanokonposite gardenak prestatu dira.
- *TGA* eta *DMA* emaitzen arabera, ATP-a osatzen duten osagaien sistema ternarioak (almidoi-glizerol-ura) BZ eta BZMMT mintzekiko afinitate desberdina erakutsi du bionanokonpositeen almidoi-osagaien konposizioa aldatuz.
- Gainera, bionanokonpositeek aurkezten dituzten propietate mekaniko eta iragazkortasun hobetuen eta aztertutako egitura trinkoaren arabera, BZ eta BZMMT mitz mikroporotsuen inpregnazioa baieztatzen da.
- Honez gain, prestatutako bionanokonpositeek biodegradagarritasuna mantentzen dute.

Bakterio-zelulosa eta uretan oinarritutako poliuretano bionanokonpositeak

- Atal honetan, BZ eduki ezberdinak (9-89%) dituzten UPUBZ nanokonpositeak prestatu dira *ex-situ* edo inpregnazio teknikaren bidez, poliuretanoaren propietateak hobetzeko asmoz.
- Gardentasunari dagokionean, nanokonposite gardenak lortu dira eta *SEM* bidez aztertu bezala, BZ nanozuntzak poliuretano matrize polimerikoarekin estaliak aurkitzen dira.
- Poliuretanoaren izaera hidrofoboari esker, honen edukia handitzean, *KA*-ren balioak handitzen dira, ur-xurgapen eta *ULI* balioak txikitzen diren heinean, ur-lurrun molekulak zelulosan xurgatu eta harrapatu geratu daitezkeelarik.

- BZ-ren berezko 3D egituraren ondorioz, nanokonpositeetan egonkortasun termiko eta propietate mekanikoetan hobekuntza nabarmena da, UPU film puruarekin konparatuz.
- Nanokonpositeak uretan murgiltzean, zelulosaren ur-xurgapenaren ondorioz deformazio hobetuak lortu dira eta UPUBZ66 laginaren aurretiazko itxura-oroimen propietatea konprobatu da.

VII.2. ETORKIZUNERAKO LAN-ILDOAK

- Erabilitako ez-ohiko hartidura-inguruneaz gain, Euskal Herrian aurkitzen diren laborantza hondakinetatik abiatuz BZ biosintetizatzea, eta hauekin bionanokonpositeen prestaketa.
- Bakterio-zelulosaren biosintesian zehar, *in-situ* teknika erabiliz, hartidura-ingurunean beste bio/polimero edo sustantzia gehituz *self-assembled* erako bionanokonpositeak lortzea eta honela, IV. atalean lorturiko bionanokonposite hibridoekin lorturiko emaitzekin alderatzea.
- BZ mintz eta filmen toxikotasun eza ikusirik, V. eta VI. atalean prestatuturiko bio/nanonokonpositeen *in-vitro* erantzun zelularren azterketa sakon bat burutzea.
- Lan honetan zehar erabilitako prestakuntza metodoaz gain, hidrolisi azidoaren bitartez BZ nanokristalak lortu eta bio/polimero ezberdinekin industrian erabiliak diren prozesatze tekniken bidez (estrusioa, injezioa, etab.) bionanokonpositen prestatzea.

VII.3. ARGITALPENAK

Lan honetan zehar lortutako emaitzak ondorengo artikuluko zientifiko eta kongresuetan aurkeztuak izan dira.

VII.3.1. Argitalpenen zerrenda

Egileak Itxaso Algar, Susana C. M. Fernandes, Gurutz Mondragon, Cristina Castro, Clara Garcia-Astrain, Nagore Gabilondo, Aloña Retegi, Arantxa Eceiza

Izenburua Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies

Aldizkaria Journal of Applied Polymer Science, 132 (1), 41237

Urtea 2015

Inpaktu-faktorea 1.768 (JCR 2015)

Posizioa 35/82 (Polymer Science) (JCR 2015)

Egileak Itxaso Algar, Clara Garcia-Astrain, Alba Gonzalez, Loli Martin, Nagore Gabilondo, Aloña Retegi, Arantxa Eceiza

Izenburua Improved permeability properties for bacterial cellulose/montmorillonite hybrid bionanocomposite membranes by *in-situ* assembling

Aldizkaria Journal of Renewable Materials, 4 (1), 57-65

Urtea 2016

Inpaktu-faktorea 1.263 (JCR 2015)

Posizioa 10/25 (Materials Science, Composites) (JCR 2015)

Egileak Itxaso Algar, Clara Garcia-Astrain, Kizkitza Gonzalez, Silvia Goyanes, Alba Gonzalez, Loli Martin, Nagore Gabilondo, Aloña Retegi, Arantxa Eceiza

Izenburua Microporous bacterial cellulose and bacterial cellulose/montmorillonite membranes for the development of starch hybrid composites (Prestakuntzan)

Egileak Itxaso Algar, Clara Garcia-Astrain, Arantzazu Santamaria-Echart, M^a Angeles Corcuera, Arantxa Eceiza, Aloña Retegi

Izenburua Relevant performance in nanocomposites based on bacterial cellulose (BC) film impregnated with waterborne polyurethane (Prestakuntzan)

VII.3.2 Kongresuen zerrenda

Egileak Itxaso Algar, Susana C.M. Fernandes, C. Freire, Gurutz Mondragon, Aitor Arbelaiz, Aloña Retegi, Cristina Peña, Iñaki Mondragon

Izenburua Síntesis de nanorefuerzos de celulosa bacterial utilizando cultivos simples

Kongresua IX Spanish Conference of Composite Materials, MATCOMP'11

Parte-hartzea Posterra

Urtea 2011

Lekua Girona, Spain

Egileak Itxaso Algar, Susana C.M. Fernandes, Gurutz Mondragon, Aloña Retegi, Aitor Arbelaiz, Cristina Peña, Iñaki Mondragon

Izenburua Biosynthesis of bacterial cellulose nanofibers using simple culture

Kongresua Congreso: 4th ECNP Young Research Conferences, ECNP Training Workshop on interfaces in nanomaterials and Industrial meeting

Parte-hartzea Posterra

Urtea 2011

Lekua Lyon, France

Egileak Itxaso Algar, Susana C.M. Fernandes, Gurutz Mondragon, Cristina Castro, Nagore Gabilondo, Aloña Retegi, Arantxa Eceiza

Izenburua Bacterial cellulose nano reinforcements biosynthesis

Kongresua VII Congreso de jóvenes investigadores en polímeros, JIP 2013

Parte-hartzea Ahozko komunikazioa

Urtea 2013

Lekua Menorca, Spain

Egileak Itxaso Algar, Kizkitza Gonzalez, Arantxa Eceiza, Aloña Retegi, Leire Urbina

Izenburua Laborantza hondakinetatik lorturiko balio erantsidun zelulosa bakteriala

Kongresua Materialen Zientzia eta Teknologia II. Kongresua. MZT

Parte-hartzea Posterra

Urtea 2014

Lekua Donostia-San Sebastián, Spain

Egileak Itxaso Algar, Leire Urbina, Alba Gonzalez, Arantxa Eceiza, Aloña Retegi

Izenburua New bionanocomposite of bacterial cellulose/montmorillonite by *in-situ* assembling

Kongresua 5th Workshop Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymer Chemistry, Eclipse Workshop, BIOPURFIL

Parte-hartzea Posterra

Urtea 2014

Lekua Donostia-San Sebastián, Spain

Egileak Itxaso Algar, Clara Garcia-Astrain, Alba Gonzalez, Loli Martin, Olatz Guaresti, Nagore Gabilondo, Aloña Retegi, Arantxa Eceiza

Izenburua Hybrid bionanocomposite by *in-situ* assembling of bacterial cellulose/montmorillonite clay

Kongresua 6th Workshop Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymer Chemistry

Parte-hartzea Posterra (Poster onenaren saria)

Urtea 2015

Lekua Bragança, Portugal

ERANSKINAK

IRUDIEN ZERRENDA

I. ATALA. SARRERA

- I.1. **Irudia.** Zelulosaren egitura.
- I.2. **Irudia.** Zelulosa polimorfismo ezberdinak lortzeko eraldaketa bideak.
- I.3. **Irudia.** Bakterio-zelulosaren sintesiaren bide metabolikoa.
- I.4. **Irudia.** *Gluconacetobacter xylinum* bakteriotik zelulosa azpielementuen paketatzea.
- I.5. **Irudia.** Montmorillonita nanobuztinaren egitura.
- I.6. **Irudia.** Almidoi osagaien egitura kimikoa.
- I.7. **Irudia.** Isozianato eta alkoholaren arteko erreakzioa uretano funtzio-taldea sintetizatzeko.

III. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA

- III.1. **Irudia.** Hartzidura-ingurune eta baldintza ezberdinetan, BZ-ren biosintesisirako jarraituriko protokoloaren eskema.
- III.2. **Irudia.** Hartzidura-ingurune eta baldintza ezberdinetan disolbaturiko oxigenoa inkubazio denboraren funtziopean: a) g x mL⁻¹-tan eta b) %-tan, hurrenez hurren.
- III.3. **Irudia.** Baldintza estatiko eta dinamikoan, P eta HS hartzidura-inguruneetan lorturiko BZ mintzen ur-atxikipen gaitasuna.
- III.4. **Irudia.** BZ ezberdinen *FTIR-ATR* espektoak.
- III.5. **Irudia.** Baldintza eta ingurune ezberdinetan lorturiko BZ laginen *CP-MAS* ¹³C *NMR* espektoak.
- III.6. **Irudia.** Baldintza eta ingurune ezberdinetan lorturiko BZ laginen *X-izpien* difrakzio profilak.
- III.7. **Irudia.** BZ ezberdinen irudi digitalak: a) BZ-P/S, b) BZ-P/D, d) BZ-HS/S eta e) BZ-HS/D.
- III.8. **Irudia.** Hartzidura-ingurune ezberdinetan eta baldintza estatikoan lorturiko BZ laginen gainazaleko *SEM* irudiak: a), b) BZ-P/S eta d), e) BZ-HS/S.

III.9. Irudia. Hartzidura-ingurune ezberdinetan eta baldintza dinamikoan lorturiko BZ laginen gainazaleko SEM irudiak: a), b) BZ-P/D eta d), e) BZ-HS/D.

III.10. Irudia. Baldintza estatikoan eta dinamikoan lorturiko BZ laginen zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a) BZ-P/S, b) BZ-P/D, d) BZ-HS/S, eta e) BZ-HS/D.

III.11. Irudia. Bi hartzidura-baldintza ezberdinetan biosintetizaturiko laginen zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a), d) BZ-P/S eta b), e) BZ-HS/D.

III.12. Irudia. a) Kontrol positiboaren (PVC), kontrol negatiboaren (HDPE), BZ mintz hezearen eta film lehorraren absorbantzia balioak 540 nm-tan inkubazio denboraren funtziopean, eta b) L-929 murino fibroblasto zelulen bideragarritasuna inkubazio denboraren funtziopean.

III.13. Irudia. Live/Dead saiakuntza: a) Kontrol negatiboa (HDPE) eta b) BZ mintza laginaren gainazalean, zelula biziak (berdez) eta zelula hilak (gorriz).

IV. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA ETA MONTMORILLONITA BIONANOKONPOSITEAK

IV.1. Irudia. Ultrasonikazio bidez prestatuturiko MMT dispertsio ezberdinak: masan (%) a) 0,5, b) 1 eta d) 2.

IV.2. Irudia. Mintz ezberdinen prestakuntzan jarraituriko protokoloaren eskema eta lorturiko laginen irudi digitalak: a) BZ mintza eta b) BZMMT mintz hibridoak.

IV.3. Irudia. Sintetizaturiko osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite film hibridoaren irudi digitalak: a) BZ, b) BZMMT7, d) BZMMT9 eta e) BZMMT13.

IV.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren FTIR-ATR espektroak.

IV.5. Irudia. X-izpien bidez lortutako BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren difrakzio profilak.

IV.6. Irudia. Liofilizaturiko mintzen zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a), b) BZ eta d), e) BZMMT9.

IV.7. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta MMT osagai puruen eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren: a) TGA eta b) DTGA termogramak.

IV.8. Irudia. Sugarrarekiko erresistentzia saiakuntzaren aurretik, bitartean eta ondorengo irudiak: a) BZ purua eta b) BZMMT9 bionanokonposite hibridoa.

IV.9. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren tentsio-deformazio kurbak.

IV.10. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren: a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak.

IV.11. Irudia. Sintetizaturiko BZ puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren: a) Ur-lurrinarekiko eta b) Oxigenoarekiko iragazkortasunak.

IV.12. Irudia. Denbora ezberdinetan BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoaren itxura aldaketa biodegradagarritasun saiakuntzan zehar.

V. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA, MONTMORILLONITA ETA ALMIDOI TERMOPLASTIKOZKO BIONANOKONPOSITEAK

V.1. Irudia. Almidoi granuluaren gelatinizazio prozesuaren *MO* irudiak: a) 0 min, b) 10 min, eta d) 20 min.

V.2. Irudia. Bionanokonposite sistema ezberdinen prestakuntzarako jarraituriko protokoloaren eskema.

V.3. Irudia. Osagai puruen eta bionanokonpositeen irudi digitalak: a) BZ, b) ATPBZ25, d) ATP, e) ATPBZ25MMT2 eta f) BZMMT9.

V.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen transmitantzia uhin-luzerarekiko: a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

V.5. Irudia. Sintetizaturiko BZ, ATP eta MMT osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen *FTIR-ATR* espektroak: a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

V.6. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen eta ATPBZ bionanokonposite sistema ezberdinen: a) *TGA* eta b) *DTGA* termogramak.

V.7. Irudia. Sintetizaturiko MMT osagai puruaren, BZMMT9 hibridoaren eta ATPBZMMT bionanokonposite sistema ezberdinen: a) *TGA* eta b) *DTGA* termogramak.

V.8. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen pilaketa modulua (E_R') eta galera-faktorearen ($Tan\delta$) bilakaera tenperaturaren aurrean: a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

V.9. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen tentsio-deformazio kurbak: a) ATPBZ eta b) ATPBZMMT bionanokonposite sistema.

V.10. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen: a) Tentsio erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioak.

V.11. Irudia. Sintetizatutako BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen: a) Oxigenoarekiko eta b) Ur-lurrinarekiko iragazkortasunak.

V.12. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta bionanokonposite sistema ezberdinetako zeharkako sekzioaren SEM irudiak: a) BZ lagina, b) ATPBZ25 eta d) ATPBZ25MMT2 bionanokonpositeak.

V.13. Irudia. Denbora ezberdinetan BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen irudi digitalak, lurpean murgilduriko biodegradagarritasun saiakuntzan.

VI. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA ETA URETAN OINARRITUTAKO POLIURETANO BIONANOKONPOSITEAK

VI.1. Irudia. Uretan oinarritutako poliuretanoaren sintesiaren eskema.

VI.2. Irudia. 2 x 2 cm²-ko BZ mintz zati batetik eta UPU ur-dispersio batetik abiatuz, UPUBZ nanokonpositea prestatzeko jarraituriko prozeduraren eskema.

VI.3. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonpositeen ezberdinen: a) Irudi digitalak eta b) Transmitantzia uhin luzeraren funtziopean

VI.4. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen FTIR-ATR espektroak.

VI.5. Irudia. a) Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite filmen kontaktu-angelua BZ edukiaren funtziopean eta b) sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta nanokonposite sistema ezberdinen ur-xurgapen ratioa denbora ezberdinetan.

VI.6. Irudia. Gainazal eta zeharkako sekzioaren *SEM* irudiak: a), d) BZ laginarentzat eta b), e) UPUBZ45 nanokonpositearentzat.

VI.7. Irudia. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite sistema ezberdinen *DSC* termogramak: a) -80-250 °C temperatura tartean, b) -80 eta -40 °C temperatura tartean eta c) 25-200 °C temperatura tartean.

VI.8. Irudia. Sintetizatutako BZ eta UPU osagai puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen: a), *TGA* eta b) *DTGA* termogramak.

VI.9. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta nanokonposite sistema ezberdinen pilaketa modulu erlatiboa (E_R) eta galera-faktorearen ($Tan\delta$) bilakaera tenperaturaren aurrean.

VI.10. Irudia. Sintetizatutako BZ eta UPU filmeen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen tentsio-deformazio kurbak.

VI.11. Irudia. Sintetizatutako BZ eta UPU puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen: a) Tentsioa erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioa.

VI.12. Irudia. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen: a), Tentsioa erresistentzia, b) Elastikotasun modulua eta d) Haustura deformazioa hezean.

VI.13. Irudia. a) Uretan murgilduriko UPUBZ66 laginak tolestu ondoren aurkezten duen itxura, b) tolesturiko lagin lehorraren itxura, d) eta e) laginaren itxura eboluzioa uretan eta f) laginak berreskuratzen duen itxura.

VI.14. Irudia. BZ osagai puruaren eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen ur-lurrunarekiko iragazkortasuna.

TAULEN ZERRENDA

III. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSAREN BIOSINTESIA

III.1. Taula. Ingurune eta hartzidura-baldintza ezberdinetan lortutako BZ laginen etekina, CHN edukiak eta azukre konposizioa.

III.2. Taula. Ingurune eta hartzidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ lagin ezberdinen polimerizazio-mailak.

III.3. Taula. Ingurune eta hartzidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ laginen kristaltasun indizeak (KI^{FTIR}).

III.4. Taula. Ingurune eta hartzidura-baldintza ezberdinetan lorturiko BZ laginen kristaltasun indizeak (KI^{XRD}).

IV. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA ETA MONTMORILLONITA BIONANOKONPOSITEAK

IV.1.Taula. BZMMT mitz hibridoen MMT edukia.

IV.2.Taula. BZMMT mintzen biosintesian lortutako etekinak.

IV.3.Taula. BZ eta BZMMT bionanokonpositeen porotasuna eta UAG balioak.

IV.4.Taula. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoen opakotasun balioak.

IV.5.Taula. Sintetizaturiko BZ osagai puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoen kristaltasun indizeak (KI^{XRD}).

IV.6.Taula. BZ puruaren eta BZMMT bionanokonposite hibridoen hezetasun-edukia, hasierako depolimerizazio tenperatura eta maximoa (T_{01} eta T_{max1}), unitate glikosidikoen hasierako eta deskonposizio maximoko tenperaturak (T_{02} eta T_{max2}) eta errauts portzentaia 800 °C-tan.

V. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA, MONTMORILLONITA ETA ALMIDOI TERMOPLASTIKOZKO BIONANOKONPOSITEAK

V.1. Taula. Sintetizaturiko bionanokonposite sistema ezberdinen ATP, BZ eta MMT eduki ezberdinak eta beraien izendapena.

V.2. Taula. Sintetizaturiko BZ eta ATP osagai puruen, BZMMT9 hibridoaren eta bionanokonposite sistema ezberdinen opakotasun balioak.

VI. ATALA. BAKTERIO-ZELULOSA ETA URETAN OINARRITUTAKO POLIURETANO BIONANOKONPOSITEAK

VI.1. Taula. Laginen izendapena eta BZ-ren edukia sintetizaturiko nanokonpositeetan.

VI.2. Taula. Sintetizaturiko BZ eta UPU osagai puruen eta nanokonposite ezberdinen opakotasun balioak.

VI.3. Taula. BZ eta UPU film puruen eta UPUBZ nanokonposite sistema ezberdinen TGA eta DTGA kurbetatik lorturiko hezetasun-edukia, hasierako degradazio tenperatura, erraunts portzentaia 700 °C-tan eta kalkulaturiko BZ edukia.

LABURDURDUREN ZERRENDA

^{13}C NMR	Karbonozko erresonantzia magnetiko nuklearra
ATP	Almidoi termoplastikoa
ATPBZMMT	Bakterio-zelulosa, montmorillonita eta almidoi termoplastikozko bionanokonpositea
BZ	Bakterio-zelulosa
BZ-HS/D	Bakterio-zelulosa Hestrin eta Scharmm ingurunean eta baldintza dinamikoan
BZ-HS/S	Bakterio-zelulosa Hestrin eta Scharmm ingurunean eta baldintza estatikoan
BZMMT	Bakterio-zelulosa eta montmorillonita bionanokonposite hibridoa
BZ-P/D	Bakterio-zelulosa pinaburu ingurunean eta baldintza dinamikoan
BZ-P/S	Bakterio-zelulosa pinaburu ingurunean eta baldintza estatikoan
CEC	Katioi trukatzeko ahalmena
CED	Kupre (II) etilendiamina
CP-MAS ^{13}C NMR	Polarizazio gurutzaturiko eta angelu-magikoaren errotazioaren bidezko karbonozko erresonantzia magnetiko nuklearra
D	Baldintza dinamikoa
DBTL	Eztainu dibutil dilauratoa
DMA	Analisi mekaniko-dinamikoa
DMPA	Azido 2,2-bis(hidroximetil)propionikoa
DO	Disolbaturiko oxigenoa
DSC	Ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala
DTGA	Analisi termograbitmetrikoaren deribatua
FTIR-ATR	Fourier-en transformatuaren espektroskopia infragorria-erreflektantzia orokor moteldua
GPC	Gel-iragazkorreko kromatografia
HPDE	Dentsitate altuko polietilenoa
HPLC	Eraginkortasun handiko kromatografia likidoa
HS	Hestrin eta Scharmm ingurunea
IPDI	Isoforona diisozianatoa

KA	Kontaktu-angelua
KI ^{FTIR}	FTIR-ATR bidez neurtutako kristaltasun indizea
KI ^{XRD}	X-izpi bidez neurtutako kristaltasun indize
LA-ICP-MS	Indukzio bidez akoplatutako plasma iturridun masa-espektometroa
MMT	Montmorillonita
OI	Oxigenoarekiko iragazkortasuna
OM	Mikroskopia optikoa
OP	Opakotasuna
P	Porotasuna
P	Pinaburu ingurunea
PD	1,3-propanodiola
PM	Polimerizazio-maila
PTMEG	Politrimetileno eter glikola
PVC	Polibinil kloruroa
S	Baldintza estatikoa
SEM	Ekorketa bidezko mikroskopia elektronikoa
SM	Segmentu malgua
SZ	Segmentu zurruna
TEA	Trietilamina
TGA	Analisi termograbitmetrikoa
THF	Tetrahidrofuranoa
UAG	Ur-atxikipen gaitasuna
ULI	Ur-lurrunarekiko iragazkortasuna
ULTT	Ur-lurrunarekiko transmisio tasa
UPU	Uretan oinarritutako poliuretanoa
UPUBZ	Bakterio-zelulosa eta uretan oinarritutako poliuretano nanokonpositea
UV-ikus	Izpi ultramore-ikuskorra espektroskopia
UXR	Ur-xurgapen ratioa
XRD	X-izpien difrakzioa

IKURREN ZERRENDA

A	Filmeen azalera
a_b	Hezetasun erlatiboa barrualdean
Abs_{600}	<i>UV-ikus</i> espektrometrikoan 600 nm-tan lortutako absorbantzia
a_k	Hezetasun erlatiboa kanpoaldean
B	Arkimidesen balantzako bultzada
E_R'	Pilaketa modulua erlatiboa
I_{200}	Difrakzioko intentsitate maximoko balioa
I_{am}	Difrakzio intentsitate sakabanatuko balioa
I_α	Zelulosa I forma alotropikoa, α mota
I_β	Zelulosa I forma alotropikoa, β mota
l	Laginen/filmeen lodiera
m	Laginaren masa
m_0	Lagin lehorraren masa
m_h	Laginaren masa hezea
m_l	Mintz/film lehorraren masa
m_t	Laginaren masa denboran zehar
\bar{M}_w	Pisuan bataz besteko masa molekularra
\bar{M}_n	Zenbakizko bataz besteko masa molekularra
P_v	Ur-lurrun saturatuaren bapore presioa 23 °C-tan
t	Denbora
T_0	Hasierako depolimerizazio edo degradazio tenperatura
T_{max}	Degradazio maximoaren tenperatura
$Tan\delta$	Galera-faktorea
η	Liskatasuna
η_0	Disolbatzailearen liskatasuna
η_{erl}	Liskatasun erlatiboa
$[\eta]$	Liskatasun intritsekoa
$\rho_{bentzenoa}$	Bentzenoaren dentsitatea
ρ_m	Mintzen dentsitatea

ρ_t	Mintzen dentsitate teorikoa
2θ	Difrakzio-angelua
λ	<i>X-izpien</i> uhin luzera
c	Laginaren kontzentrazioa
d	Kristal planoen arteko distantzia
n	Difrakzio-maila
$[A]_{\text{control}}$	Lagin-zelulen absorbantzia
$[A]_{\text{tet}}$	Kontrol negatiboko zelulen absorbantzia

