

# Bionanofabrication as a sustainable principle for obtaining bacterial nanocellulose

## Bionanofabricación como principio sostenible de obtención de nanocelulosa bacteriana

L. Fuentes<sup>1</sup>, V. Calvo<sup>1</sup>, D. Berdejo<sup>2</sup>, W.K. Maser<sup>1</sup>, J. M. González-Domínguez<sup>1\*</sup>, A. M. Benito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Carboquímica (ICB-CSIC), C/ Miguel Luesma Castán 4. 50018 Zaragoza, España.

<sup>2</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, 50013, Spain.

\*Corresponding author: jmgonzalez@icb.csic.es

### Abstract

Bionanofabrication refers to the production of nanomaterials derived from living beings. Within this strategy, bacterial nanocellulose (BNC) finds its place, which is produced by specific bacteria directly in the nanoscale. This concept emerges as a sustainable alternative, since it is generated in its pure form, being able to dispense with the purification steps typically required to obtain cellulose of vegetable origin. BNC is initially produced as a hydrogel and can be subsequently dried through a variety of methods to yield an aerogel or a xerogel, each having numerous beneficial characteristics that allow it to be used across diverse fields, ranging from the food industry to biomedicine. Due to its excellent properties and enormous potential, it becomes necessary to explore new methodologies and strategies that can reduce production time while aiming for improved BNC generation, encompassing new features and functionalities.

### Resumen

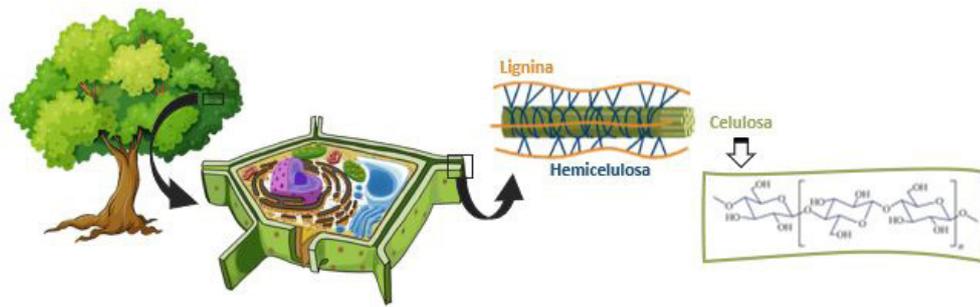
La bionanofabricación hace referencia a la producción de nanomateriales a partir de seres vivos. Dentro de esta estrategia se encuentra la producción de nanocelulosa bacteriana (NCB), la cual se produce directamente a partir de determinadas bacterias en la nano escala. Este concepto surge como una alternativa sostenible, ya que se genera de manera aislada, pudiendo prescindir de las etapas de purificación requeridas en la obtención de la celulosa de origen vegetal. La NCB inicialmente se produce en forma de hidrogel y después se puede secar por diversos métodos para tener un aerogel o un xerogel, contando cada opción con numerosas características beneficiosas que permiten su empleo en diversos campos, que van desde la industria alimentaria hasta la biomedicina. Debido a sus excelentes propiedades y enorme potencial, es necesario investigar nuevas metodologías y estrategias que ayuden a reducir el tiempo de producción, a la vez de que busquen la generación de NCB mejorada, abarcando nuevas características y funcionalidades.

El término 'bionanofabricación' alude al uso de seres vivos para producir nanomateriales a partir de la acción cooperativa de biomoléculas, mayormente biopolímeros y enzimas [1]. De esta manera, una metodología que se puede asociar a este término es

la producción de nanocelulosa bacteriana (NCB), la cual sigue un procedimiento "bottom-up" en el que la nanocelulosa se sintetiza por ciertas especies bacterianas aerobias, como un componente puro integrante de las biopelículas que forman.

A pesar de que existe celulosa de diversas fuentes renovables que pueden ser utilizadas como materia prima (algodón, residuos agrícolas, desperdicios de comida, y/o pulpa de madera), la celulosa de esta procedencia se suele encontrar en presencia de otros biopolímeros que no son tan útiles, o no gozan de las mismas propiedades, como son las hemicelulosas o la lignina [2], tal y como se muestra en la *Figura 1*. Esto hace que sea necesario la extracción de la celulosa mediante procedimientos de separación, utilizando reactivos como ácidos o bases concentradas, disolventes orgánicos o líquidos iónicos, por nombrar algunos, lo cual supone un impacto medioambiental muy negativo en términos de escalado.

El cultivo de NCB se muestra como una alternativa que mejora la sostenibilidad de la producción de celulosa, a la vez que proporciona propiedades innatas de mayor calidad a partir de la producción de un nanomaterial de alta pureza con una generación mínima de residuos. Así, esta metodología no requiere el uso de tratamientos químicos agresivos para el aislamiento o purificación de la celulosa. En esta aproximación *bottom-up*, la NCB se sintetiza directamente en la nanoescala y de manera aislada por medio del metabolismo de las propias bacterias, como un producto extracelular. Existen varios géneros en los que se engloban especies capaces de hacer esto, tales como las *Komagataeibacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Dickeya*, *Sarcina*, y *Rhodobacter* [3]. Todas ellas tienen algo en común: son bacterias aerobias. Esto se debe a que el proceso metabólico involucrado necesita oxígeno, ya que la NCB se obtiene a partir de la fermentación oxidativa de azúcares simples como, por ejemplo, fructosa, glucosa o sacarosa [4]. El proceso metabólico que tiene lugar comienza con la entrada de los azúcares en el citoplasma bacteriano, donde sufren diversas transformaciones hasta obtener UDPG (glucosa uracilo-difosfato). Este compuesto es suministrado al complejo celulosa sintasa, localizado en la membrana celular. Así, la celulosa se va polimerizando en el exterior, en la interfaz existente entre el medio de cultivo y el aire,



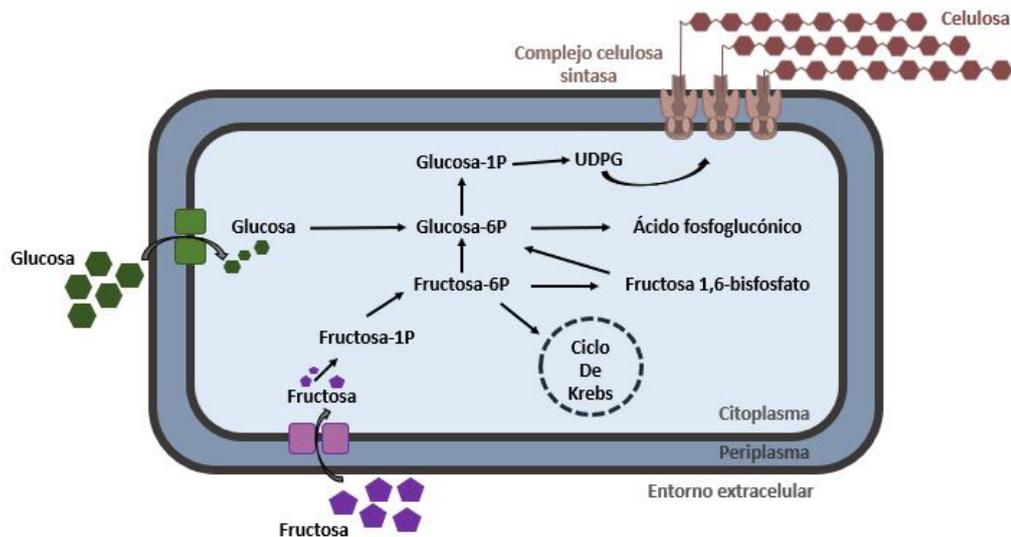
**Figura 1.** Biopolímeros asociados a las fibras de celulosa que tienen que ser eliminados en el proceso de obtención de celulosa de origen vegetal

**Figure 1.** Biopolymers associated to the cellulose fibers that have to be eliminated in the plant-based cellulose obtaining process.

dando lugar a la formación de nanofibras de celulosa que se enmarañan progresivamente, resultando macroscópicamente en un hidrogel de NCB (Figura 2).

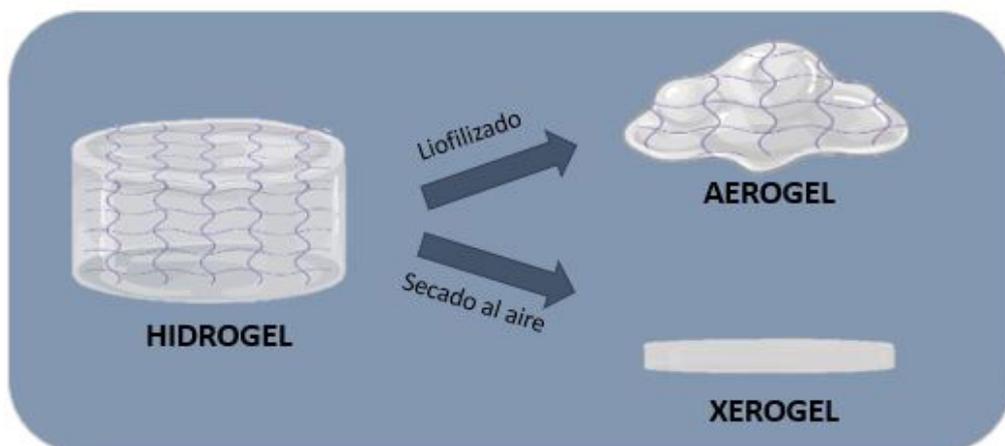
Los hidrogeles obtenidos se pueden utilizar como tal en un sinfín de aplicaciones, pero también se pueden secar, produciendo xerogeles o aerogeles (Figura 3), según las necesidades de la aplicación

prevista. Los xerogeles, más compactos y rígidos, se obtienen mediante el secado al aire y permiten estudiar parámetros como el rendimiento del proceso de producción; mientras que los aerogeles, de muy baja densidad y alta compresibilidad, se obtienen por liofilización, permitiendo conservar el grado de hinchamiento y la porosidad del hidrogel original en el material final [5].



**Figura 2.** Esquema del proceso metabólico involucrado en la producción de NCB

**Figure 2.** Schematics of the metabolic process involved in the BNC production.



**Figura 3.** Esquema de la morfología en ambas formas de secado de los hidrogeles: xerogeles y aerogeles

**Figure 3.** Schematics of the morphology in both hydrogel drying forms: xerogels and aerogels.

Pese a que la composición de la NCB es la misma que la de la celulosa vegetal ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ ), sus propiedades físico-químicas son diferentes por el tamaño de las fibras y el método de producción. Especialmente, la NCB se caracteriza por tener un alto grado de cristalinidad (84-89%), sin perjuicio de la posibilidad de modificación química intrínseca de la celulosa [6] (debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo en su estructura), buenas propiedades mecánicas con alta resistencia a la tracción en comparación con otros biomateriales debido a la red fibrilar entrecruzada por la que está formada [7], buena flexibilidad, alta porosidad, y una capacidad excelente de retención de agua [8].

Gracias a todas estas propiedades, este nanomaterial puede tener muchas aplicaciones en campos diversos. La NCB ha sido reconocida como un material seguro por la *Food and Drug Administration* (FDA), permitiendo su uso en la producción de envases inteligentes para comida [9]. Además, su biocompatibilidad, durabilidad y baja respuesta inflamatoria probada *in vivo*, posibilita la producción de implantes para el cuerpo humano fabricados a partir de este nanomaterial [10]. Ejemplo de ello es la preparación de apósitos para la piel [11], o para inducir la regeneración de tejidos [12]. También presenta una gran habilidad de mantener su forma y una alta velocidad de transmisión del sonido en amplios rangos de frecuencia, lo cual permite su uso como diafragma para altas frecuencias en altavoces y auriculares [13].

En este sentido, el Grupo de Nanoestructuras de Carbono y Nanotecnología (G-CNN,) perteneciente al Instituto de Carboquímica (ICB-CSIC), está investigando la posibilidad de emplear la NCB en la remediación de aguas para la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales, como pueden ser metales pesados, compuestos orgánicos y sustancias químicas tóxicas [14]. Para ello, la producción de los hidrogeles se está optimizando en base al cultivo bacteriano y a sus propiedades físicas, de manera que se aprovecha la elevada porosidad y el carácter hidrofílico de los aerogeles resultantes para fabricar adsorbentes eficientes que permitan capturar y retener estos contaminantes, mejorando la calidad del agua tratada [14]. Además, por su estructura porosa y capacidad de retención de partículas, los aerogeles también pueden ser empleados en la fabricación de membranas o filtros para purificación de agua, actuando así, como una alternativa más segura para la eliminación de contaminantes químicos.

Es importante tener en cuenta que, si bien la nanocelulosa bacteriana muestra un gran potencial en la remediación de aguas, su aplicación a gran escala está en desarrollo y requiere más investigación y optimización. En este sentido, actualmente, GCNN está trabajando en la mejora del cultivo de bacterias con el objetivo de reducir los tiempos de producción e incrementar los rendimientos del proceso, manteniendo sus propiedades físicas intactas. También están investigando en otras aplicaciones,

carbonizando la NCB para hacer materiales de carbono nanoporosos que puedan emplearse como soporte en catálisis [15] [16].

En resumen, las propiedades únicas de la nanocelulosa bacteriana la posicionan como un material muy prometedor para contribuir a la mejora de la calidad del agua y la protección del medioambiente. Para poder implementar la fabricación de NCB y llevarla a aplicaciones de interés, los tiempos de producción y el coste deben ser reducidos, por ejemplo, a partir de la revalorización de residuos como precepto de economía circular. Además, el futuro de la NCB se encamina hacia el desarrollo de nuevas metodologías que permitan controlar la dimensionalidad y morfología de este material, a la vez que se generen anisotropías que den lugar a nuevas propiedades y funcionalidades. De esta manera, se podrían mejorar, incluso desarrollar nuevas aplicaciones de la NCB utilizando tecnologías avanzadas como la impresión 3D [17] o la microencapsulación [18] para aplicaciones en áreas como agricultura, alimentación y cosmética, entre otras.

## REFERENCIAS

- [1] V. Calvo, J. M. González-Domínguez, A. M. Benito, and W. K. Maser, 'Synthesis and Processing of Nanomaterials Mediated by Living Organisms', *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 61, no. 9, Feb. 2022, doi: 10.1002/anie.202113286.
- [2] F. Esa, S. M. Tasirin, and N. A. Rahman, 'Overview of Bacterial Cellulose Production and Application', *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, vol. 2, pp. 113–119, 2014, doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.017.
- [3] D. Lin, Z. Liu, R. Shen, S. Chen, and X. Yang, 'Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects', *Int J Biol Macromol*, vol. 158, pp. 1007–1019, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.230.
- [4] S. S. de Souza *et al.*, 'Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium', *Cellulose*, vol. 26, no. 3, pp. 1641–1655, Feb. 2019, doi: 10.1007/s10570-018-2178-4.
- [5] M. Zeng, A. Laromaine, and A. Roig, 'Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties', *Cellulose*, vol. 21, no. 6, pp. 4455–4469, Nov. 2014, doi: 10.1007/s10570-014-0408-y.
- [6] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, and A. Bohn, 'Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material', *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 44, no. 22, pp. 3358–3393, May 30, 2005. doi: 10.1002/anie.200460587.
- [7] S. Gorgieva and J. Trček, 'Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications', *Nanomaterials*, vol. 9, no. 10, MDPI AG, Oct. 01, 2019. doi: 10.3390/nano9101352.
- [8] M. Moniri *et al.*, 'Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering', *Nanomaterials*, vol. 7, no. 9, MDPI AG, Sep. 04, 2017. doi: 10.3390/nano7090257.
- [9] Z. Shi, Y. Zhang, G. O. Phillips, and G. Yang, 'Utilization of bacterial cellulose in food', *Food Hydrocolloids*, vol. 35, pp. 539–545, Mar. 2014. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.012.

- [10] G. Helenius, H. Bäckdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm, and B. Risberg, 'In vivo biocompatibility of bacterial cellulose', *J Biomed Mater Res A*, vol. 76, no. 2, pp. 431–438, Feb. 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30570.
- [11] L. Fu, J. Zhang, and G. Yang, 'Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair', *Carbohydr Polym*, vol. 92, no. 2, pp. 1432–1442, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071.
- [12] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown, 'The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications', *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2007, doi: 10.1021/bm060620d.
- [13] M. Iguchi, S. Yamanaka, and A. Budhiono, 'Review Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts', 2000. doi: 10.1023/A:1004775229149.
- [14] V. Calvo *et al.*, 'Optimizing Bacterial Cellulose Production Towards Materials for Water Remediation', P. Petkov, M. E. Achour, and C. Popov, Eds., in *NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2020, pp. 391–403. doi: 10.1007/978-94-024-2018-0\_31.
- [15] Y. Wan, F. Zhang, C. Li, G. Xiong, Y. Zhu, and H. Luo, 'Facile and scalable production of three-dimensional spherical carbonized bacterial cellulose/graphene nanocomposites with a honeycomb-like surface pattern as potential superior absorbents', *J Mater Chem A Mater*, vol. 3, no. 48, pp. 24389–24396, 2015, doi: 10.1039/c5ta07464a.
- [16] Y. Huang *et al.*, 'Amorphous Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoshells coated on carbonized bacterial cellulose nanofibers as a flexible anode for high-performance lithium ion batteries', *J Power Sources*, vol. 307, pp. 649–656, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jpowsour.2016.01.026.
- [17] M. Schaffner, P. A. Rühls, F. Coulter, S. Kilcher, and A. R. Studart, '3D printing of bacteria into functional complex materials', *Sci Adv*, vol. 3, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.1126/sciadv.aao6804.
- [18] M. Pepicelli, M. R. Binelli, A. R. Studart, P. A. Rühls, and P. Fischer, 'Self-grown bacterial cellulose capsules made through emulsion templating', *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 7, no. 7, pp. 3221–3228, Jul. 2021, doi: 10.1021/acsbmaterials.1c00399.