



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Producción de celulosa por microorganismos
de interés tecnológico

Bacterial cellulose production by
microorganisms of technological interest

Autor/es

Javier Torrubia Pradas

Director/es

Domingo Blanco Parmo

Facultad de Veterinaria
2019

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	4
2. RESUMEN.....	1
2.1 Abstract.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Polímeros y celulosa	3
3.2 Celulosa bacteriana	4
3.3 <i>Komagataeibacter xylinus</i>	5
3.4 Propiedades de la celulosa bacteriana	6
3.5 Cultivo de la celulosa bacteriana	7
3.6 Aplicaciones de la celulosa bacteriana	8
3.7 Futuro de la celulosa bacteriana	9
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	10
5. METODOLOGÍA.....	11
5.1. Determinar la temperatura óptima para la generación de celulosa bacteriana	12
5.2. Determinar el pH óptimo del medio de cultivo	12
5.3. Determinar la mejor fuente de carbono del medio de cultivo	12
5.4. Determinar la mejor fuente de nitrógeno del medio de cultivo	13
5.5 Determinar la influencia de la adición de NaCl y Etanol al 1% al medio de cultivo.	13
5.6. Estudiar la influencia de la agitación del medio de cultivo	14
5.7. Establecer la influencia del diámetro del matraz en la superficie del hidrogel de celulosa.	14
5.8. Lavado y secado de los hidrogeles de celulosa obtenidos	15
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1. Determinar la temperatura óptima para la generación de la celulosa	16
6.2. Determinar el pH óptimo del medio de cultivo	17
6.3. Determinar la mejor fuente de carbono del medio de cultivo	18
6.4. Determinar la mejor fuente de nitrógeno del medio de cultivo	20
6.5. Determinar la influencia de la adición de NaCl y Etanol al 1% al medio de cultivo.	21
6.6. Estudiar la influencia de la agitación del medio de cultivo	21
6.7. Estudiar la influencia del diámetro del matraz en la superficie del hidrogel de celulosa.	23
6.8. Generación de múltiples hidrogeles de CB	24
7. CONCLUSIONES	26
7.1 Conclusions	28
8. VALORACIÓN PERSONAL	30

9. BIBLIOGRAFÍA	31
10. ANEXOS.....	35

1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CB	Celulosa bacteriana
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Da	Daltons
HSm	Medio Hestrin-Schramm modificado
IC	Índice de cristalinidad
ICB	Instituto de Carboquímica
WL	Wallerstein Laboratories

2. RESUMEN

La celulosa es una alternativa renovable a los plásticos de consumo masivo, pero su fabricación a partir de los métodos clásicos no es sostenible por el uso de ácidos y bases fuertes para la eliminación de compuestos como hemicelulosas y lignina, que generan una elevada cantidad de residuos. La celulosa bacteriana (CB) tiene un procesamiento más sencillo al generarse sin productos secundarios, y además posee un mayor índice de cristalinidad y unas propiedades mecánicas más interesantes que la celulosa de las plantas.

Esta investigación se lleva a cabo en conjunto aunando el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria con el Instituto de Carboquímica, con objetivos diferentes pero en una misma dirección: hallar las condiciones óptimas de generación de CB, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo.

En este trabajo se caracteriza la cepa productora de celulosa *Komagataeibacter xylinus* y se buscan las mejores condiciones de cultivo para conseguir la mayor producción de CB. Para ello, se busca alcanzar el valor óptimo en cuanto a temperatura de incubación, pH del medio, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, agitación o no del medio de cultivo y adición de productos al medio de cultivo tales como el etanol o el cloruro sódico.

Para el desarrollo experimental, se adquirió una cepa de *Komagataeibacter xylinus* en la Colección Española de Cultivos Tipo, la cual fue sometida a diferentes pruebas con el fin de verificar lo revisado en la bibliografía científica en cuanto a factores que condicionan la producción de CB, ya sean factores intrínsecos del propio medio de cultivo o extrínsecos como la temperatura de incubación o la agitación de los matraces.

Tras la finalización de las pruebas realizadas y en base a los resultados obtenidos, se consiguieron definir las mejores condiciones para la producción de CB en lo que a tiempo de generación respecta.

2.1 Abstract

Cellulose is a renewable alternative to mass consumption plastics, but its manufacture from classical methods is not sustainable due to the use of strong acids and bases, which carry a high amount of waste. Bacterial cellulose (BC) has a simpler processing when generated without secondary products, and also has a higher crystallinity index and more interesting mechanical properties than plant cellulose.

This research is carried out jointly by combining the Department of Animal Production and Food Science of the Faculty of Veterinary with the Institute of Carbochemistry, with different objectives but in the same direction; find the optimal conditions of BC generation, both from the quantitative point of view as qualitative.

In this work, *Komagataeibacter xylinus* producing strain is characterized and the best culture conditions are sought to achieve the highest BC production. To do this, look for the optimal value in terms of incubation temperature, pH of the medium, carbon source, nitrogen source, agitation or not of the culture medium and addition of products to the culture medium such as ethanol or sodium chloride.

For experimental development, a strain of *Komagataeibacter xylinus* was acquired in the Spanish Type Culture Collection, which was subjected to different tests in order to verify what was reviewed in the Scientific literature regarding factors that condition the production of BC, and be intrinsic factors of the culture medium itself or extrinsic such as the incubation temperature or the shaking of the flasks.

After the completion of the tests carried out and based on the results obtained, the best conditions for the production of BC were defined in terms of generation time.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Polímeros y celulosa

Los polímeros son fundamentales en nuestra sociedad, estando presentes en multitud de productos como ordenadores, productos de la industria textil o envases de comida, entre otros. Las principales razones de su importancia son su versatilidad y bajo coste de producción, sin embargo, existen diferentes problemas asociados con el medio ambiente a causa de la producción de estos polímeros pertenecientes a fuentes de energía no renovables (Shchipunov, 2012).

Los bioplásticos son una alternativa al uso de los plásticos ordinarios, ya que provienen de fuentes de energía renovables y además contienen menos contaminantes. A pesar de esto, la producción de bioplásticos tiene un elevado coste y los posibles campos de aplicación son más reducidos. Estas razones refuerzan la idea de continuar buscando una manera de alcanzar una producción sostenible de estos materiales (Mohanty, Misra y Drzal, 2002).

Un riesgo añadido al consumo excesivo de estos plásticos es la contaminación del agua potable, una fuente de energía renovable pero no inagotable, con cuatro mil millones de personas que se enfrentan a una escasez de agua potable al menos una vez al año (Mekonnen y Hoekstra, 2016). Este es un problema no sólo de una sociedad consumista, sino también de procesos industriales y de la degradación de plásticos y otros materiales en ríos y pozos subterráneos.

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra, y el principal componente estructural de las plantas. La celulosa se utiliza para producir papel y cartón, o en aplicaciones más específicas como recubrimientos, membranas o en la industria farmacéutica.

Su estructura es fibrilar y está formada por anillos de D-glucosa polimerizados y unidos por enlaces β -1,4. Sus características más importantes son el carácter hidrofílico, la biodegradabilidad y la capacidad de ser modificada químicamente para crear productos como el acetato de celulosa o la nitrocelulosa (Klemm et al., 2005).

Existen múltiples fuentes renovables para la obtención de celulosa, destacando el algodón, la madera o los deshechos agrícolas/alimenticios. A pesar de la ventaja de proceder de una fuente renovable, junto a la celulosa están presentes otros biopolímeros como la lignina o las hemicelulosas, cuya utilidad es menor que la de la celulosa.

Los métodos tradicionales para procesar la celulosa y liberarla de polímeros contaminantes requieren de la utilización de ácidos y bases fuertes o líquidos orgánicos para su purificación. Este enfoque no coincide con los principios de la química sostenible debido al excesivo aporte de energía y reactivos, que además incrementan de forma significativa el precio del producto final (Klemm et al., 2005; Esa, Tasirin y Rahman, 2015).

3.2 Celulosa bacteriana

Con el fin de mejorar la sostenibilidad y abaratar el coste de producción de la celulosa, además de mejorar sus propiedades, es de suma importancia desarrollar un proceso que conduzca a un producto de alta pureza con una mínima generación de residuos. Estos principios pueden cumplirse mediante la obtención de celulosa bacteriana (CB).

Existen numerosas bacterias de diferentes géneros capaces de generar celulosa bacteriana. Entre los géneros más característicos destacan los géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*...

Las bacterias aerobias pertenecientes a los géneros previamente nombrados, son capaces de producir hidrogeles de CB por fermentación oxidativa de sacáridos como glucosa o fructosa. Dichos hidrogeles de celulosa se producen en la interfaz entre el medio de cultivo y el aire, generando una red tridimensional de fibras nanométricas orientadas aleatoriamente con una elevada superficie y gran porosidad (Zeng, Laromaine y Roig, 2014).

Las bacterias son capaces de producir CB con el único requerimiento de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, lo que facilita en gran medida el procesamiento generando una celulosa más pura y cristalina.

La composición del medio de cultivo se puede optimizar para aumentar la velocidad de producción y las características del material. Los hidrogeles tal y como se fabrican se

pueden secar, terminando en xerogeles mediante la deshidratación, o en aerogeles, cuando el secado se produce mediante la liofilización. La principal y sustancial diferencia entre ambos tipos de geles es la porosidad.

De entre todos los géneros, las bacterias más estudiadas y que mayor producción han generado son las pertenecientes al G° *Gluconacetobacter*, más concretamente la especie *Gluconacetobacter xylinus*, actualmente denominada *Komagataeibacter xylinus*; esta bacteria ha otorgado los mejores resultados hasta el momento en cuanto a producción de celulosa. (Huang et al., 2014)

3.3 *Komagataeibacter xylinus*

El subgénero *Gluconacetobacter* fue un subgénero perteneciente al género *Acetobacter* hasta el año 1998, año en el que pasó a convertirse en un nuevo género de bacterias gracias a la publicación de Yamada, Hoshino e Ishikawa (1997), en la que establecieron que las especies clasificadas y examinadas del entonces subgénero *Gluconacetobacter* estaban bastante a nivel filogenético de las especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, por lo que deberían clasificarse en un nuevo género de bacterias, el género *Gluconacetobacter*.

En 2012, Yamada et al. (2012), establecieron las diferencias fenotípicas y filogenéticas entre los grupos *Gluconacetobacter liquefaciens* y *Gluconacetobacter xylinus*, lo que les llevó a proponer un nuevo género que permitiera separarlos y que acabó conociéndose como G° *Komagataeibacter*. El nombre “*Komagataeibacter*” hace honor al Dr. Komagata, profesor y microbiólogo de la Universidad de Tokio, que contribuyó a la sistemática y clasificación de muchas especies bacterianas, especialmente a la de las bacterias acéticas.

Se incluyeron 12 especies diferentes en el género *Komagataeibacter*, todas ellas Gram- e inmóviles, con un tamaño de 0,5-0,8 x 1,0-3,0 μm y cuyas colonias son de color crema y suaves en el medio Hestrin-Scharmm (HS). Son capaces de oxidar el acetato y el lactato en agua y CO₂, así como de producir ácido acético a partir de etanol. Algunas de ellas requieren de ácido acético para su crecimiento, así como otras tienen la capacidad de producir materiales celulósicos (Yamada et al., 2012).

Entre todas las especies pertenecientes al G^o *Komagataeibacter*, la especie *Komagataeibacter xylinus* ha sido la más estudiada y la que mejores resultados a reportado en lo que respecta a producción de CB (Huang et al., 2014).

Se trata de un microorganismo perteneciente al reino Monera, a la clase Alphaproteobacterias, al orden Rhodospirillales y a la familia *Acetobacteraceae*. Es una bacteria Gram-, aerobia estricta e inmóvil como todas las pertenecientes al G^o *Komagataeibacter*.

Sus colonias en el medio Hestrin-Schramm modificado (HSm), uno de los medios más utilizados en lo que a producción de celulosa se refiere, poseen un color blanco-crema y un aspecto mucoso. Se trata de una bacteria apatógena y cuyas características bioquímicas más importantes se muestran en la siguiente figura (Lavasani et al., 2017).

Table 1. Characterization tests for *K. xylinus* identification

Characterization tests	<i>K. xylinus</i>
Catalase	+
Oxidase	-
Indole production	-
Sodium citrate utilization	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
H ₂ S formation	-
Urea utilization	-
Cellulose production	+
Growth on 3% (v/v) ethanol in the presence of acetic acid 5-8%	-
Gelatin liquefaction	-
Requirement of acetic acid for growth	-
Growth on malachite-green 0.01% agar	-
Growth on the medium of CaCO ₃	v
Growth at pH 2	+
Acid formation from glucose	+
Acid formation from sucrose	v
Acid formation from fructose	v
Acid formation from lactose	v
Acid formation from maltose	v

Tabla 1. Características bioquímicas de *Komagataeibacter xylinus*. (Lavassani et al., 2017)

3.4 Propiedades de la celulosa bacteriana

La CB producida por *K. xylinus* o por otro microorganismo productor posee una pureza superior a la celulosa vegetal, debido fundamentalmente al mecanismo de síntesis de esta. Esta pureza le confiere propiedades muy características tales como una elevada cristalinidad (en torno al 80%), resistencia mecánica, estabilidad térmica y maleabilidad.

Además de sus propiedades, la celulosa de origen bacteriano no es tóxica ni causante de reacciones alérgicas (Huang et al., 2014).

Otra característica de la CB es su alto grado de polimerización, llegando a alcanzar los 20.000 Da en algunos casos y considerablemente mejor captadora de agua que la celulosa vegetal. La CB es capaz de captar agua hasta cien veces su peso, lo que la convierte en un material muy interesante para filtración de aguas.

Tanto las propiedades de la CB como la cantidad producida varían durante la síntesis debido a la cepa utilizada para su generación, las características del medio y las condiciones de cultivo (temperatura, pH, fuentes de carbono y nitrógeno, etc.) (Zhao et al., 2018).

3.5 Cultivo de la celulosa bacteriana

Como se ha descrito anteriormente, los microorganismos productores de celulosa sólo requieren de una fuente de carbono y de nitrógeno para generar celulosa extracelular y estar bajo condiciones apropiadas de temperatura y pH del medio.

Diferentes medios de cultivo con variaciones en la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y otros parámetros han sido probados para el desarrollo de CB, destacando los medios Hestrin-Schramm, Yamanaka y Zhou, los cuales han reportado los resultados más satisfactorios. (Mohammadkazemi, Azin y Ashori, 2015)

Para evaluar la producción de CB se tienen en cuenta dos aspectos. Por un lado, el tiempo de generación de la celulosa, siendo el resultado más satisfactorio cuanto menor sea el tiempo de generación. Por otro lado, el rendimiento de producción, siendo calculado mediante el cociente entre el peso en gramos de la celulosa generada y los litros de medio de cultivo utilizados. Cabe destacar que, para poder calcular el rendimiento de producción, la CB debe ser previamente lavada y secada para purificarla.

Además, dependiendo de si el cultivo se realiza mediante condiciones estáticas o con cierta agitación, el rendimiento y la estructura de la CB varía. El cultivo en estático genera un hidrogel de celulosa con una estructura tridimensional definida y manejable, mientras que el cultivo con agitación inducida genera la celulosa en forma de nebulosa inestable. A pesar de que la estructura que se consigue en condiciones estáticas es más definida, los rendimientos más altos señalados han sido con agitación (Huang et al., 2014).

3.6 Aplicaciones de la celulosa bacteriana

Debido a las propiedades descritas anteriormente, entre las que destacan su elevada pureza y sus propiedades físico-químicas inusuales, la CB ofrece una gran variedad de campos y aplicaciones potenciales (Tabla 2).

De todas las aplicaciones, la más conocida es la que se ha dado en el campo de la medicina. La elevada fuerza mecánica de la celulosa de origen bacteriano, su elevada porosidad y permeabilidad tanto a líquidos como a gases y la poca irritación de la piel que provoca el contacto la convierten en un perfecto sustituto de la piel en el tratamiento de quemaduras severas. Además, en este mismo campo, la CB ha sido utilizada como material para la sustitución de vasos sanguíneos gracias a la gran resistencia mecánica que aportan sus fibras.

Al margen de estas aplicaciones en el ámbito clínico, también se está desarrollando el uso de CB en la fabricación de papel donde parece que mejoran las propiedades de este al aumentar tanto su duración como su flexibilidad. Las características de la celulosa generada por las bacterias son ideales en su uso como papel moneda o como papel destinado a la elaboración de libros. (Kilmer, 2010)

Industria	Aplicaciones
Cosmética	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas. Generación de uñas artificiales.
Textil	Material de alta absorción acuosa.
Refinería	Material para absorción de toxinas y aceites.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad.
Alimentos	Aditivo de alimentos, emulsificante, fibra dietética.
Maquiladora	Componente de partes y refacciones.
Turística	Ropa deportiva y equipo de acampar.
Investigación	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía.
Tecnología	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos.
Medicina	Fabricación de "piel artificial" en terapia de quemaduras. Componente en implantes dentales.

Tabla 2. Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano (Krystynowicz y Bielecki, 2002).

3.7 Futuro de la celulosa bacteriana

Además de las aplicaciones en áreas como la medicina o la industria del papel nombradas anteriormente, se están investigando nuevos campos de aplicación en los cuales la celulosa de origen bacteriano puede desempeñar un papel muy importante.

La capacidad de la CB de dejar pasar a su través líquidos y gases la convierte en un material potencialmente exitoso en la filtración de aguas, ya que podría retener los contaminantes que pudiera llevar, motivo por el cual se está investigando acerca de esta aplicación.

La problemática de la CB reside en su elevado coste de producción, ya que para conseguir producciones y rendimientos muy elevados se debe recurrir a bioreactores con un coste muy elevado que se traduce en un coste disparatado de los productos finales (Sukara y Meliawati, 2016).

De la necesidad de emplear materiales más económicos y reducir las contaminaciones se están realizando numerosas investigaciones sobre el uso de desechos o subproductos alimentarios que sirvan como base para la generación sostenible y más económica de CB como el estudio de Andritsou et al. (2018) acerca de la síntesis y la caracterización de CB procedente de residuos de cítricos.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo surge de un proyecto de investigación llevado a cabo por el Instituto de Carboquímica (ICB), un centro de Zaragoza dependiente del CSIC y cuyo principal objetivo era averiguar las mejores condiciones para generar una celulosa de origen bacteriano con la pureza y cristalinidad más altas posibles y unas propiedades físicas específicas para desarrollar nuevas aplicaciones.

Para alcanzar dicho objetivo principal se contó, también, con la participación de personal perteneciente al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Ambos centros con objetivos diferentes pero en una misma dirección, siendo el objetivo primordial del Instituto de Carboquímica el nombrado con anterioridad y la producción de celulosa de origen bacteriano el objetivo principal de este trabajo.

La producción de todos los hidrogeles de CB se llevó a cabo en la Facultad de Veterinaria, siendo posteriormente trasladados al ICB para su posterior procesado y análisis.

Así pues, se define el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) como:

- Hallar las condiciones óptimas de generación de celulosa bacteriana tanto desde el punto de vista cuantitativo, obteniendo el mayor rendimiento de producción como desde el punto de vista cualitativo, consiguiendo una celulosa con las propiedades más destacadas.

Para la consecución de este objetivo principal se desarrollan, a su vez, los siguientes subobjetivos:

1. Determinar la temperatura óptima para la generación de CB.
2. Establecer el pH óptimo del medio de cultivo.
3. Verificar cuál es la mejor fuente de carbono del medio de cultivo.
4. Determinar la mejor fuente de nitrógeno del medio de cultivo.
5. Determinar la influencia de la adición de NaCl y Etanol al 1% al medio de cultivo.
6. Estudiar la influencia de la agitación del medio de cultivo.
7. Estudiar la influencia del diámetro del matraz en la superficie del hidrogel de celulosa.

5. METODOLOGÍA

Para la consecución del objetivo principal, se adquirió la cepa *Komagataeibacter xylinus* NCIMB 5346 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), activada en una placa de Petri con Agar Glucosa Levadura, medio donde la bacteria se desarrolla con facilidad; está constituido por 100 gramos de glucosa como fuente de carbono, 10 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, 20 gramos de CaCO₃, 15 gramos de agar como gelificante y 1 litro de agua destilada.

Una vez recepcionada la cepa, se inocularon dos colonias en dos tubos con 10 mL de caldo Glucosa Levadura (previamente esterilizados en un autoclave P-SELECTA [PRESOCLAVE 75] y enfriados), cuya composición era la misma que el medio sólido excluyendo el agar. Además, se sembraron por agotamiento otras dos colonias de *K. xylinus* en dos placas de Petri idénticas a la placa original. Por último, se conservó el microorganismo en crioviales y se almacenaron a una temperatura de - 80 °C.

Previamente a la descripción de las pruebas realizadas, es conveniente resaltar los siguientes puntos:

- Todos los matraces Erlenmeyer se cerraron a media rosca o a medio tapar debido al carácter aeróbico de *K. xylinus*
- Todos los Erlenmeyer fueron inoculados con una colonia de *K. xylinus* aislada previamente en una placa de Petri con agar WL, un medio selectivo que permite el aislamiento e identificación de bacterias ácido-acéticas y cuyas colonias presentan una coloración verdosa en este medio. (Hurtado et al., 2011)

Las placas con el medio WL se sembraron por agotamiento con una colonia de *K. xylinus* procedente del medio Glucosa Levadura y fueron incubadas en la estufa a 30°C/ 7 días/ condiciones aeróbicas.

- Las estufas de incubación diferentes utilizadas en las pruebas eran de la marca P-SELECTA.

5.1. Determinar la temperatura óptima para la generación de celulosa bacteriana

Para establecer la temperatura óptima a la cual la producción de CB fuera máxima, se utilizaron 8 matraces Erlenmeyer de 250 mL con el medio Hestrin-Schramm modificado (HSm); este es el medio de cultivo que, según la bibliografía, mejores resultados ha otorgado en la generación de CB. El medio consta de un 2% de glucosa, 0,5% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,27 % fosfato disódico y 0,115% de ácido cítrico. En cada uno de los 8 matraces señalados se añadieron 100 mL del medio HSm y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos en un autoclave P-SELECTA. Tras su esterilización y posterior enfriado, se inoculó cada uno con una colonia de *K. xylinus*. Dos matraces fueron incubados a una temperatura de 30°C, dos a 37 °C, otros dos a 20°C y los últimos 2 bajo refrigeración a 4°C, de forma que mediante la determinación del tiempo de generación de la celulosa se hallara la temperatura idónea.

5.2. Determinar el pH óptimo del medio de cultivo

Para la búsqueda del pH más eficaz se utilizaron 5 pHs distintos (4.4, 5.0, 5.5, 6.0 y 7.0) y el mismo medio de cultivo reseñado anteriormente. Se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de la misma capacidad para cada valor de pH y se fijó una temperatura de 30°C para la incubación de los diez matraces, dado que ésta es la temperatura de referencia de la CECT. La duración de la prueba se extendió hasta las dos semanas.

Para ajustar el valor del pH de los Erlenmeyer, se adicionó ácido cítrico al 10% o NaOH 0,1 N. Para determinar el pH del medio, se utilizó un pHmetro CRISON con medición en continuo.

5.3. Determinar la mejor fuente de carbono del medio de cultivo

Para determinar la mejor fuente de carbono en relación a la producción de celulosa bacteriana, se optó por ensayar 2 monosacáridos (fructosa y glucosa), 2 disacáridos (lactosa y sacarosa) y 2 polialcoholes (manitol y sorbitol).

Se prepararon, al igual que en los casos precedentes, 2 matraces Erlenmeyer para cada fuente de carbono. El medio estaba compuesto por un 2% de la fuente de carbono seleccionada y un 0,5% tanto de extracto de levadura como de peptona. Cada uno de los 12 matraces de 250 mL contenía 100 mL del medio de cultivo. Todos los matraces fueron incubados en la estufa a 30°C durante un período de dos semanas.

5.4. Determinar la mejor fuente de nitrógeno del medio de cultivo

Para el cumplimiento del objetivo, se tuvieron en cuenta varias fuentes de nitrógeno diferentes y la combinación de algunas de ellas, de forma que se ensayaron: peptona, extracto de levadura, extracto de levadura a doble concentración, extracto de levadura + peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + peptona y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + extracto de levadura.

Se prepararon dos matraces Erlenmeyer de 250 mL para cada fuente de nitrógeno. Todos los matraces contenían el mismo caldo de cultivo; 2 % de glucosa y un 0,5% de la fuente de nitrógeno correspondiente. Los dos matraces con extracto de levadura a doble concentración fueron una excepción, ya que cada uno contenía un 1% de extracto de levadura.

Todos los Erlenmeyer fueron incubados durante dos a una temperatura de 30°C.

5.5 Determinar la influencia de la adición de NaCl y Etanol al 1% al medio de cultivo.

Estudiando la bibliografía, diversos autores han afirmado un aumento en la producción de celulosa bacteriana tras la adición al medio de cantidades de etanol de entre 0,5-2 % (Mohammadkazemi, Doosthoseini y Azin, 2015). *K. xylinus*, al tratarse de una acetobacteria, es capaz de transformar el etanol en ácido acético en presencia de aire, por lo que dicho alcohol podría actuar como nutriente en el medio de cultivo. De hecho, *K. xylinus* es una bacteria que se aísla frecuentemente de vinagres artesanales (Lavasani et al., 2017)

Por otro lado, se buscó volver el medio algo más disgenésico mediante la adición de NaCl al 2%, teniendo en cuenta que *K. xylinus* no es ni un microorganismo halófilo ni halotolerante. El propósito de la prueba era ver si la bacteria era capaz de generar CB bajo esas condiciones.

La primera prueba se llevó a cabo mediante la preparación de seis matraces Erlenmeyer. Todos ellos contenían el mismo medio de cultivo (HSm), sin embargo, variaban en su contenido de etanol. Dos de los matraces contenían exclusivamente 100 mL del medio de cultivo HSm y no se les adicionó etanol, de forma que sirvieran como matraces de control. Dos de los matraces contenían 100 mL del medio de cultivo HSm junto con 2% de etanol. Por último, los dos matraces restantes un 5% de etanol. La prueba tuvo una duración de dos semanas, y los seis matraces fueron incubados en la estufa a 30°C.

La influencia de la adición de NaCl al medio de cultivo se llevó a cabo preparando cuatro matraces. Dos de los matraces se utilizaron como referencia, y sólo contenían 100 mL del medio de cultivo HSm. Por otro lado, los otros dos matraces Erlenmeyer se prepararon con 100 mL del medio HSm adicionando además un 2% de NaCl. Los matraces fueron incubados durante dos semanas a 30°C.

5.6. Estudiar la influencia de la agitación del medio de cultivo

Debido a lo referenciado en la bibliografía acerca de la celulosa bacteriana, se buscó comprobar la diferencia y eficacia entre producir la celulosa bajo condiciones estáticas o producirla bajo agitación de los matraces.

Los matraces se sometieron a agitación en un agitador orbital marca OVAN durante dos semanas y a una temperatura de 30°C. El medio de cultivo de los matraces fue de nuevo el medio HSm.

5.7. Establecer la influencia del diámetro del matraz en la superficie del hidrogel de celulosa.

El diámetro del hidrogel de celulosa es un indicador de la producción de celulosa, puesto que, cuanto mayor sea el diámetro del hidrogel, mayor será su superficie y su volumen y, por tanto, también su peso.

Para comprobar si la relación entre el diámetro del matraz y el diámetro del hidrogel de celulosa son directamente proporcionales, se prepararon cuatro matraces Erlenmeyer con dos diámetros diferentes. Todos los matraces contenían 100 mL del medio de cultivo HSm, ya que se buscaba únicamente estudiar la influencia del diámetro del matraz. Dos de los Erlenmeyer eran de 125 mL de capacidad y los dos restantes de 250 mL. Los 4 matraces fueron incubados a 30°C durante dos semanas.

5.8. Lavado y secado de los hidrogeles de celulosa obtenidos

Una vez obtenidos los hidrogeles, deben purificarse para eliminar los restos de bacterias atrapadas en el mismo. Para ello, se emplean los siguientes pasos:

1. Se sumerge cada hidrogel en 250 mL de agua destilada en ebullición durante 40 minutos.
2. Los hidrogeles obtenidos del paso anterior se sumergen en 150 mL de NaOH 0,1 M durante 20 minutos a 90°C. Se realiza este paso cuatro veces seguidas.
3. Se neutralizan los hidrogeles por inmersión en un exceso de agua destilada durante un mínimo de 24 horas.

Una vez que el agua en la que está el hidrogel alcanza un pH neutro, se procede al secado del hidrogel, que puede ser realizado mediante secado al aire (con ayuda de un desecador) o por liofilización, en función de las pruebas estipuladas por el ICB.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para expresar los resultados de una forma clara y concisa, van a ser separados de forma que se muestren los resultados de cada uno de los subobjetivos del trabajo junto con su oportuna discusión.

6.1. Determinar la temperatura óptima para la generación de la celulosa

En la siguiente tabla se muestra el número de días que transcurrieron hasta la generación completa de los hidrogeles de celulosa para cada una de las temperaturas de incubación.

Temperatura (°C)	Tiempo de generación de los hidrogeles (días)	
	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2
4	*	*
20	13	14
30	5	5
37	*	*

**No se ha generado hidrogel de CB*

Tabla 3. Tiempos de generación de los hidrogeles de CB en días obtenidos a diferentes temperaturas de incubación.

Como se muestra en la Tabla 3, los matraces incubados bajo condiciones de refrigeración (4°C) no presentaron desarrollo de CB transcurrido el periodo de dos semanas. Estos resultados eran de esperar debido a las condiciones adversas que genera esta temperatura.

Por otra parte, tampoco se observó desarrollo de celulosa en los matraces incubados a 37°C. Según Son et al. (2001), a temperaturas superiores a 35°C, las bacterias acéticas se multiplican con mayor dificultad debido a la desnaturalización de ciertos componentes de las células tales como ácidos nucleicos o proteínas.

En los matraces incubados a 20°C, se observó desarrollo de un hidrogel de celulosa consistente transcurridos 13 y 14 días, un dato subóptimo en comparación con el resultado obtenido en los matraces incubados a 30°C.

El resultado más satisfactorio se encontró, coincidiendo con la investigación de Zahan et al. (1998), en los matraces incubados a 30°C. Se encontró un hidrogel consistente de celulosa bacteriana transcurridos únicamente 5 días en ambos matraces, lo que indica que, para maximizar el rendimiento de producción de CB, la temperatura de elección es de 30°C.

6.2. Determinar el pH óptimo del medio de cultivo

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos tras la prueba de dos semanas con objetivo de averiguar el pH óptimo en lo que respecta a la producción de CB y a conseguir una celulosa de la más alta pureza posible.

Valor de pH	Tiempo de generación de los hidrogeles (días)	
	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2
4,4	5	5
5,0	6	6
5,5	6	6
6,0	7	7
7,0	*	*

**No se ha generado hidrogel de CB*

Tabla 4. Tiempos de generación en días de los hidrogeles obtenidos en relación al pH del medio de cultivo

Como se muestra en la tabla 4, no se ha detectado generación de CB en ninguno de los dos matraces de pH 7. Este valor difiere de lo reportado por Coban (2011), que observó crecimiento de CB en un rango de pH de 4-7. Sin embargo, concuerda con lo reportado

en el estudio de Dirisu et al. (2017) acerca del efecto del pH y de los cambios de este durante la producción de biocelulosa, donde no hallaron crecimiento de CB a pH 7 y 8.

Los resultados obtenidos en el rango de pH 4,4 - 6 no distan mucho entre ellos y coinciden con la bibliografía científica, donde se ha fijado la máxima producción de CB en el rango de pH de 4-6 (Du et al., 2018).

El mejor resultado se obtuvo con los matraces con un pH de 4,4, debido a que ambos generaron un hidrogel de CB perfectamente formado transcurrido un período de sólo 5 días, por lo que se fija este valor de pH como el idóneo en la producción de CB.

6.3. Determinar la mejor fuente de carbono del medio de cultivo

La Tabla 5 nos muestra la producción de CB en función del tipo de azúcar empleado:

Fuente de carbono	Tiempo de generación (días)	
	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2
Glucosa	5	5
Sacarosa	7	7
Fructosa	6	6
Lactosa	*	*
Sorbitol	*	*
Manitol muestra 1	10	9

* No generación de hidrogeles de celulosa transcurrido un período de dos semanas.

Tabla 5. Tiempos de generación de los hidrogeles de CB en días obtenidos según la fuente de carbono utilizada

Como se aprecia en la tabla anterior sobre las diferentes fuentes de carbono probadas, no se observó ningún desarrollo de celulosa en los matraces incubados durante dos semanas que contenían lactosa y sorbitol como fuente de carbono.

Por otro lado, en los dos monosacáridos empleados (glucosa y fructosa) se reflejan los resultados más satisfactorios, generándose un hidrogel de CB perfectamente formado transcurridos solo 5 días en el caso de los matraces con glucosa y 6 días en los que contenían fructosa. Como indican Molina-Ramírez et al., (2017) en su investigación sobre la influencia de la fuente de carbono en la producción de CB y en el que también utilizaron el microorganismo *Komagataeibacter xylinus*, los rendimientos más elevados tras un período de 48h se consiguieron mediante glucosa (1,89 g/L) y fructosa (1,79 g/L).

En cuanto al uso de manitol como principal fuente de carbono, diversos estudios la han reflejado como la fuente más eficaz y que mayores rendimientos produce. En la producción de CB, la fuente de carbono es el precursor clave necesario para la síntesis de glucosa, entrando en la ruta de la pentosa-fosfato o en la ruta de la gluconeogénesis. Sin embargo, el manitol puede ser la fuente más eficiente actuando como intermediario en la generación de UDP-glucosa para la síntesis de CB que otras fuentes de carbono (Coban, 2011).

El resultado obtenido con la sacarosa fue ligeramente menos satisfactorio que el obtenido con glucosa y fructosa. La sacarosa es un disacárido (glucosa y fructosa), por lo que las bacterias deben hidrolizarla primero para poder metabolizar la glucosa y fructosa; de ahí la demora en la generación de los hidrogeles de CB.

6.4. Determinar la mejor fuente de nitrógeno del medio de cultivo

En la Tabla 6 se muestran los tiempos de generación de los hidrogeles de CB obtenidos tras las dos semanas de incubación en los matraces con fuentes de nitrógeno diferentes:

Fuente de nitrógeno	Tiempo de generación de los hidrogeles (días)	
	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2
Extracto de levadura + peptona	5	5
Extracto de levadura doble concentración	6	7
Peptona	7	8
Extracto de levadura	8	8
Extracto de levadura + (NH ₄) ₂ SO ₄	6	6
Peptona + (NH ₄) ₂ SO ₄	*	*

*No se ha generado hidrogel de CB

Tabla 6. Tiempos de generación de hidrogeles de CB en días obtenidos según la fuente de nitrógeno empleada.

Como se muestra en la tabla anterior, los peores resultados obtenidos, a excepción de los matraces que contenían peptona + (NH₄)₂SO₄, son los obtenidos en los matraces con una única fuente de nitrógeno (peptona o extracto de levadura).

Por otro lado, los resultados más satisfactorios recaen en los matraces con una fuente de nitrógeno orgánica compuesta, siendo esto coincidente con lo reportado en la bibliografía científica (Yodsuwan et al., 2012).

En los matraces cuya fuente de nitrógeno estaba compuesta de extracto de levadura y peptona se generó un hidrogel de CB en ambos matraces transcurrido un período de 5 días. Esta combinación de extracto de levadura + peptona como fuente de nitrógeno

orgánico es utilizada en el medio Hestrin-Schramm modificado, el cual ha sido empleado como principal medio de cultivo para la producción de CB (Zhao et al., 2018).

Por último, los matraces con extracto de levadura a doble concentración y extracto de levadura + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno han otorgado resultados satisfactorios, aunque sigue siendo preferible la combinación entre extracto de levadura y peptona.

6.5. Determinar la influencia de la adición de NaCl y Etanol al 1% al medio de cultivo.

Una vez terminado el ensayo para establecer la influencia del NaCl, se observó que la adición de éste en una cantidad del 2% inhibía completamente la producción de CB. Se demuestra que este microorganismo es significativamente sensible a la presencia de sal; carece de halotolerancia.

Por otro lado, la adición de etanol para mejorar la producción de CB puede ser interesante. Según diversos estudios (Son et al., 2003; Jagannath, et al, 2008), la producción de CB se ve claramente influenciada por la adición de etanol. El etanol puede influir en las enzimas involucradas en la síntesis de celulosa. Por ejemplo, cuando se produce ATP por etanol, este inhibe la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual incluye glucosa-6-fosfato en la ruta de la pentosa-fosfato. Por lo tanto, una cantidad óptima de etanol adicionada al medio de cultivo mejora los resultados obtenidos.

En el caso del presente estudio, no se observó desarrollo de CB en ninguno de los matraces a los que se adicionó un 5% de etanol. Sin embargo, en los matraces que contenían un 2% de etanol se generó un hidrogel perfectamente formado de celulosa con un día de antelación con respecto a los matraces de referencia sin etanol añadido; esto concuerda con los estudios previamente nombrados y que reflejan que la adición de etanol al medio de cultivo estimula la producción de CB.

6.6. Estudiar la influencia de la agitación del medio de cultivo

Transcurridas las dos semanas de la prueba, se pudo observar de forma clara la diferencia entre incubar los matraces bajo condiciones estáticas o someterlos a agitación en un agitador orbital.

Como se aprecia en la siguiente imagen (Figura 1), la celulosa generada en un matraz que ha sido sometido a cierta agitación adquiere una forma de nebulosa inconsistente y muy frágil, que dificulta tanto su extracción como el posterior lavado y tratamiento de los hidrogeles.

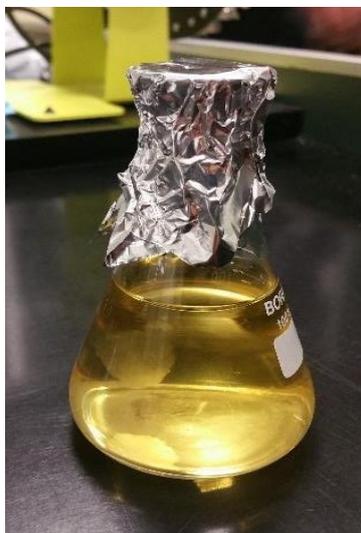


Figura 1. CB obtenida bajo condiciones de agitación (agitador orbital) en el medio HSm durante dos semanas a 30°C.

Por otro lado, en los matraces incubados bajo condiciones estáticas, el hidrogel de celulosa se desarrolla en la superficie del líquido, en la interfaz líquido/aire, por lo que la forma que adopta es de un gel con estructura tridimensional mucho más consistente y definitivamente preferible para la extracción del hidrogel de celulosa y sus tratamientos posteriores (Ver figura 2).



Figura 2. CB obtenida bajo condiciones estáticas.

6.7. Estudiar la influencia del diámetro del matraz en la superficie del hidrogel de celulosa.

Tras las dos semanas de incubación de los matraces, se observó una relación directamente proporcional entre el diámetro del matraz y el diámetro que adopta el hidrogel de celulosa.

En la figura 3 se observan hidrogel de celulosa obtenidos en un matraz de 125 mL. Como se aprecia en la figura, los hidrogel tienen un diámetro homogéneo y una forma circular, coincidente con la superficie aire/líquido del matraz.

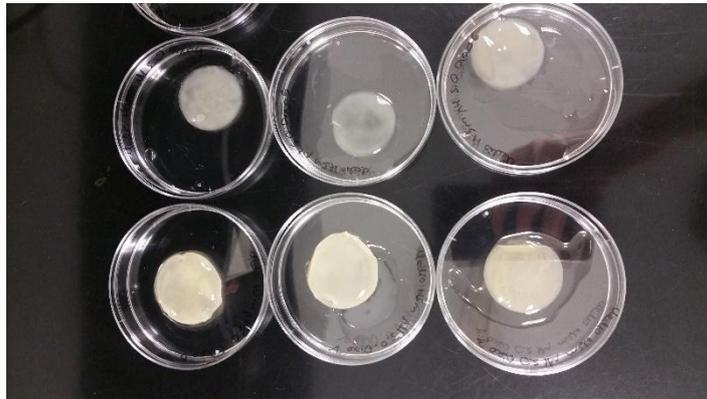


Figura 3. Hidrogel de CB producidos en matraces de 125 mL. Extraídos y depositados en placas de Petri.

Por otra parte, en la siguiente imagen (figura 4), se ve claramente el aspecto circular y el tamaño homogéneo pero superior de los hidrogel de CB. Este aumento de tamaño se debe a que se utilizaron matraces de 250 mL, de ahí que el diámetro de estos sea considerablemente superior a los obtenidos en matraces 125 mL.

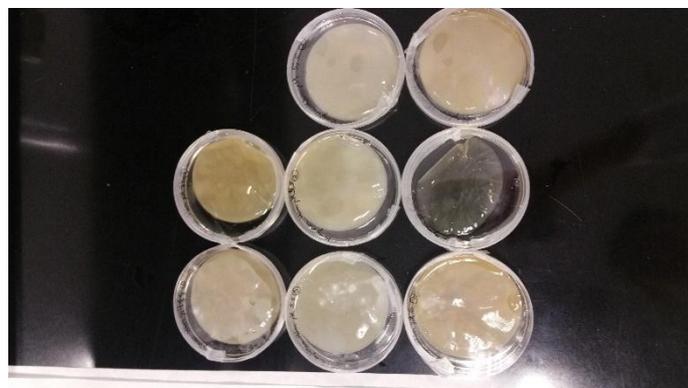


Figura 4. Hidrogel de CB obtenidos en matraces de 250 mL. Extraídos y depositados en placas de Petri.

Debido a que el hidrogel de celulosa se desarrolla en la interfase líquido/aire del matraz y adopta una forma circular, sus dimensiones son prácticamente idénticas que las de la circunferencia de la superficie del líquido. En base a esto, en lo que respecta a la obtención de la mayor producción de celulosa bacteriana y al mayor rendimiento, será conveniente utilizar matraces de la máxima capacidad posible, puesto que se generarán hidrogeles de un tamaño superior y con ello, un peso superior como se demuestra en las imágenes anteriores.

6.8. Generación de múltiples hidrogeles de CB

Además de los resultados de todas las pruebas ya mencionados, cabe destacar la capacidad de *K. xylinus* de generar, de forma continuada, hidrogeles de CB.

Una vez que el primer hidrogel ha sido completamente formado en la interfaz aire/líquido del matraz, se deposita en el fondo de este a causa de su propio peso, lo que permite la formación de un nuevo hidrogel en la superficie (Ver Figura 5).



Figura 5. Múltiples hidrogeles de CB generados a 30°C en el medio HSm tras una incubación prolongada (más de 30 días).

Como se muestra claramente en la Figura 5, *K. xylinus* genera hidrogeles de CB de forma continuada hasta cubrir la totalidad del medio de cultivo. El tiempo que transcurre entre la generación de un hidrogel y el siguiente es prácticamente idéntico siempre y dependiente de las condiciones de incubación y nutrientes del medio ya explicados en este trabajo.

Esta característica es muy relevante para la producción de CB, ya que se pueden extraer los hidrogeles ya generados en el matraz para dar lugar a la producción de más hidrogeles y con ello mejorar considerablemente la producción de CB.

7. CONCLUSIONES

Tras la realización de las pruebas encaminadas a averiguar las condiciones idóneas para la mayor producción de CB, se extraen las siguientes conclusiones:

1. La temperatura óptima para la producción de CB es de 30°C.
2. El rango idóneo de pH para la generación de CB es de 4,4-6,0, siendo 4,4 el valor que ha aportado mejores resultados.
3. De todas las fuentes de carbono testadas, los medios de cultivo con monosacáridos como única fuente de carbono (glucosa y fructosa) han otorgado los resultados más satisfactorios, siendo la glucosa ligeramente superior a la fructosa.
4. En relación a la fuente de nitrógeno, la combinación de estos dos compuestos orgánicos, peptona y extracto de levadura, proporciona el mejor resultado.
5. Se ha demostrado que el NaCl condiciona la producción de CB, ya que con una limitada cantidad de 2% en el medio de cultivo, no posibilita desarrollo de CB.
6. La adición de etanol en una cantidad de 2% al medio de cultivo incentiva la producción de CB.
7. El cultivo en estático da lugar a un hidrogel tridimensional de celulosa bacteriana más compacto, fácil de extraer y de tratar que la forma irregular y frágil de nebulosa que se obtiene con la agitación.
8. Cuanto mayor es el diámetro del matraz, mayor es el diámetro del hidrogel de CB y, por tanto, mayor peso, por lo que para aumentar la producción es conveniente utilizar matraces de gran tamaño.
9. Los hidrogeles se producen de forma continuada en el matraz y caen al fondo de éste hasta cubrir la totalidad del medio de cultivo
10. El tiempo de generación entre un hidrogel de CB y el siguiente es prácticamente constante y depende de las condiciones de incubación y características del medio de cultivo.

La presente investigación podría ser desarrollada y continuada de las siguientes maneras:

- Buscando otros productos que, adicionados al medio de cultivo, consigan estimular y enaltecer la producción de CB.
- Empleando desechos o subproductos alimentarios con el fin de abaratar los costes de producción de la CB y con ello disminuir el coste del producto final.

7.1 Conclusions

After carrying out all the tests related to the search for the ideal conditions for the main production of CB, see the following conclusions:

1. The optimum temperature for CB production is 28-30°C.
2. The ideal range for CB generation is 4.4-6.0, with 4.4 being the value that has provided the best results at the end of the test.
3. Of all proven carbon sources, culture media with monosaccharides as the sole source of carbon (glucose and fructose) have given the most satisfactory results, with glucose being slightly higher than fructose.
4. With respect to the nitrogen source, the combination of peptone and yeast extract as a nitrogen source has given the best result of all.
5. It has been detected that NaCl is not effective for the production of CB, since with an amount of 2% in the culture medium CB development has not been observed.
6. The amount of ethanol in an amount of 2% for the culture medium improves the production of CB
7. Static culture results in a three-dimensional disc of bacterial cellulose that is easier to extract and treat than the irregular shape of the nebula obtained after shaking the flasks.
8. The larger the diameter of the flask, the larger the diameter of the CB hydrogel and, therefore, greater weight, so that to increase production it is convenient to use large-sized flasks.
9. Hydrogels are produced continuously in the flask and fall to the bottom of the flask to cover the entire culture medium
10. The generation time between a CB hydrogel and the next is relatively constant and dependent on the incubation conditions and characteristics of the culture medium.

This research could be developed and continued in the following ways:

- Looking for other products that, addicted to the culture medium, get stimulating and exalt the production of CB.
- By using food waste or by-products in order to reduce the production costs of the CB and thereby reduce the cost of the final product.

8. VALORACIÓN PERSONAL

Gracias a la realización del trabajo de fin de grado he adquirido una serie de conocimientos y competencias que estoy seguro de que me servirán en el ámbito laboral para desarrollar mi trabajo de la mejor manera posible. Entre todas las competencias y conocimientos destaco las siguientes:

- Capacidad de lectura y análisis de artículos científicos, extrayendo las ideas principales y de interés para mi trabajo.
- Realizar una revisión bibliográfica que recopile artículos y documentos sobre la celulosa de origen bacteriano
- Mejorar mis habilidades en el laboratorio y aprender a trabajar de una manera más organizada y eficiente.
- Aprender a trabajar mano a mano y en equipo con los compañeros del Instituto de Carboquímica para desarrollar el proyecto de la mejor manera posible.
- Aprender a implementar información teórica aprendida en las diferentes asignaturas del grado y utilizarlas en conjunción para la realización del trabajo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Andritsou, V. et al. (2018) ‘Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources’, *ACS Omega*, 3(8), pp. 10365–10373. doi: 10.1021/acsomega.8b01315.

Coban, E. P. (2011) ‘Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium’, *African Journal of Microbiology Research*, 5(9). doi: 10.5897/ajmr11.008.

Costa, A. F. S. et al. (2017) ‘Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources’, *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2017.02027.

Dirisu, C. et al. (2017) ‘pH Effect and pH Changes during Biocellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* in *Moringa oleifera* Tea-Sugar Medium’, *Journal of Advances in Microbiology*, 7(2), pp. 1–7. doi: 10.9734/jamb/2017/38440.

Du, R. et al. (2018) ‘Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 194(April), pp. 200–207. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.04.041.

Esa, F., Tasirin, S. M. y Rahman, N. A. (2014) ‘Overview of Bacterial Cellulose Production and Application’, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. Elsevier Srl, 2, pp. 113–119. doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.017.

Huang, Y. et al. (2014) ‘Recent advances in bacterial cellulose’, *Cellulose*, 21(1), pp. 1–30. doi: 10.1007/s10570-013-0088-z.

Hurtado, M. et al. (2011) ‘Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Acéticas en Materia Prima y Tren de Fermentación’, *Revista técnicaña*, (27), pp. 4–10.

Kilmer, P. D. (2010) ‘Review Article: Review Article’, *Journalism: Theory, Practice & Criticism*, 11(3), pp. 369–373. doi: 10.1177/1461444810365020.

Klemm, D. et al. (2005) “Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”, *Angewandte Chemie*, 44(22), pp. 3358-3393.

Lavasani, P. S. et al. (2017) ‘Isolation and identification of komagataeibacter xylinus from Iranian traditional vinegars and molecular analyses’, *Iranian Journal of Microbiology*, 9(6), pp. 338–347.

Mekonnen, M. M. y Hoekstra, A. Y. (2016) ‘Sustainability: Four billion people facing severe water scarcity’, *Science Advances*, 2(2), pp. 1–7. doi: 10.1126/sciadv.1500323.

Mohammadkazemi, F., Azin, M. and Ashori, A. (2015) ‘Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media’, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 117, pp. 518–523. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.008.

Mohammadkazemi, F., Doosthoseini, K. and Azin, M. (2015) ‘Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (bc) production by gluconacetobacter xylinus (ptcc 1734)’, *Cellulose Chem. Technol*, 49(5–6), pp. 5–6. Disponible en: [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT5-6\(2015\)/p.455-462.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT5-6(2015)/p.455-462.pdf).

Mohanty, A., Misra, M. y Drzal, L. T. (2002). “Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources in Green Materials World”, *Journals Of Polymers and the Enviroment*, 10(4), pp. 19-26.

Molina-Ramírez, C. *et al.* (2017) 'Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*', *Materials*, 10(6). doi: 10.3390/ma10060639.

Shchipunov, Y. (2012) 'Bionanocomposites: Green sustainable materials for the near future', *Pure and Applied Chemistry*, 84(12), pp. 2579–2607. doi: 10.1351/PAC-CON-12-05-04.

Sukara, E. and Meliawati, R. (2016) 'Potential Values of Bacterial Cellulose for Industrial Applications', *Jurnal Selulosa*, 4(01). doi: 10.25269/jsel.v4i01.51.

Yamada, Y., Hoshino, K. I. and Ishikawa, T. (1997) 'The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(8), pp. 1244–1251. doi: 10.1271/bbb.61.1244.

Yamada, Y. *et al.* (2012) 'Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)', *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), pp. 397–404. doi: 10.2323/jgam.58.397.

Yodsuan, N. *et al.* (2012) 'Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Bacterial Cellulose Production for Bionanocomposite Materials', (March 2017), pp. 2005–2010.

Zeng, M., Laromaine, A. y Roig, A. (2014) “Bacterial Cellulose Films: Influence of Bacterial Strain and Drying Route on Film Properties”, *Cellulose*, 21(6), pp. 4455-4469. doi: 10.1007/s10570-014-0408.

Zhao, H. et al. (2018) ‘Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources’, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. Taylor & Francis, 32(2), pp. 350–356. doi: 10.1080/13102818.2017.1418673.

10. ANEXOS

ANEXO I: Trabajo final del proyecto de investigación para la revista “NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics”.

Optimizing Bacterial Cellulose Production towards Materials for Water Remediation

Víctor Calvo^{1#}, Javier Torrubia,^{2#} Enrique García-Bordeje,¹ Wolfgang K. Maser,¹ Domingo Blanco,² Ana M. Benito,¹ Jose M. González-Domínguez¹¹

1. Instituto de Carboquímica, ICB-CSIC, C/ Miguel Luesma Castán 4, 50018 Zaragoza, Spain
2. Department of Animal Production and Food Science, Veterinary Faculty, University of Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

**jmgonzalez@icb.csic.es*

Cellulose is a renewable alternative to mass consumption plastics, but its manufacture from classical methods is not sustainable due to the use of large amounts of strong acids, bases and/or organic species (e.g. ionic liquids) in its production, generating many residues. Bacterial cellulose (BC) has a simpler processing because it is much more cleanly generated. In this work, BC aerogels and xerogels are compared in order to ascertain how the bacterial culture conditions (pH and carbon source) and the raw hydrogels processing determine their thermal stability, crystallinity index, swelling ratio and flammability. The most notable results are the influence of the drying method on the swelling ratio and the carbon source on the thermal stability. Finally, a feasible application of BC aerogels is presented by treating contaminated water and by capturing water within a non-polar solvent, taking advantage of the dry BC sorption capacity.

Keywords: Bacterial cellulose, sustainability, nanotechnology, environment, water remediation

1. Introduction

Polymers are fundamental tools in our society, being present in a myriad of products such as computers, food packaging or textiles. The main reasons of their importance are versatility, low cost of production and wide variety of properties; however, there are different problems related to the environmental burden associated to polymer production from non-renewable materials (e.g. petrol)¹ and the deficient management that has been traditionally followed for plastics re-use and recycling.

Bioplastics are an alternative to ordinary plastics as they are produced from renewable sources, entailing a lesser extent of contaminants upon degradation. Nevertheless, bioplastics

These authors contributed equally

possess a higher cost of production and not so many areas of application, reasons why it is imperative to continue exploring and investigating a way to reach a sustainable development of these materials.²

An additional risk associated to an excessive consumption is the contamination of drinking water, a renewable resource but not endless, with about four billion people facing scarcity of drinking water at least 1 month a year.³ This is a problem not only derived from a consumerist society but also due to different industrial processes and to the degradation of plastics and other materials in rivers and underground wells.

Cellulose is the most abundant biopolymer on Earth, and the main structural component of plants, widely used to produce paper and cardboard, or more specific applications like coatings, membranes or pharmaceuticals. Its structure is fibrillar and is formed by polymerized D-glucose rings linked by β -1,4 bonds. Its most important characteristics are hydrophilic character, chirality, biodegradability and the possibility of chemical modification to create products like cellulose acetate or nitrocellulose.⁴

There are multiple renewable sources to obtain cellulose, namely cotton, wood pulp or agricultural/food waste, but in these vegetable materials the concomitant presence of other biopolymers such as lignin or hemicelluloses (that are not as useful as cellulose) makes it necessary to perform a thorough separation procedure to isolate cellulose. Traditional methods to process cellulosic materials need of strong acids and bases, or even organic liquids, to obtain cellulose with a certain degree of purity. This approach does not match at all with the principles of green and sustainable chemistry because of the excessive energy and reagents input, significantly rising the price of the final products.^{4,5}

In order to improve the sustainability and affordability of cellulose production, besides improving its native properties, it is of paramount importance to develop a straightforward process leading to a high purity product with minimum generation of residues. These principles can be fulfilled by bacterial cellulose (BC). Aerobic bacteria belonging to the *xylinus* genus are able to produce hydrogels of BC by oxidative fermentation of saccharides like glucose or fructose. Such cellulose hydrogels are produced in the interface between the culture medium and the air, generating a three dimensional network of nanosized fibres, randomly oriented with high surface area and porosity.⁶

Bacteria produce BC without need of any other inputs, easing the processing and generating a purer and more crystalline cellulose. The composition of the culture medium can be optimized to increase the production rate and the characteristics of the materials.⁵ The as-made hydrogels can be dried, ending up in xerogels or aerogels, having a critical influence in the swelling degree and the porosity of the final material.⁶ Actually, there is a huge investigation effort to make use of residues, derived from large-scale production surpluses, to generate BC; for instance, corn steep liquor⁷ or industrial waste,⁸ thus reasserting the feasibility and affordability of BC production. However, every bacterial strain needs particular conditions not only to optimally produce BC, but also to provide useful materials with the best features, reason why it is of special relevance to study the influence of the bacterial culture conditions on the eventual characteristics of processed BC materials.

In the present work we report on the synthesis and characterization of BC materials, in which the composition of the bacterial culture medium (namely pH and carbon source) has been explored to be related to the final properties of derived xerogels and aerogels, with particular focus on their thermal stability and crystallinity. The aim is to achieve nanocellulose materials with optimal properties to be used for water remediation by tuning the production step.

2. Experimental

2.1 Materials and production methodology

BC hydrogels were produced by *Komagateibacter xylinus* bacteria, bought to the *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT), Valencia (Spain), in fresh form (Nº 473). All reagents were purchased to Sigma Aldrich (reagent grade) with no further treatment. The initial culture medium was the Hestrin-Shramm (HSM) in aqueous solution.⁹ To modify the pH, sodium hydroxide or citric acid were used. Additionally, three different carbon sources were tested: glucose, fructose and saccharose. The bacterial culture was carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks at a stable temperature in the range of 28-30°C. In the interface between the air and the culture medium BC hydrogels are formed, and when their size is big enough, they tend to fall to the bottom of the flask, so then they can be removed and processed.

2.2 Cleaning and drying of bacterial cellulose hydrogels

Hydrogels need to be cleaned in order to eliminate the residues from the bacteria and the culture medium. The cleaning procedure, for every hydrogel piece, starts by immersion in 250 ml of boiling deionized water for 40 minutes. Afterwards, it is soaked four times in 150 ml of NaOH 0,1M at 90 °C for 20 minutes. A subsequent neutralization is then performed with an excess of deionized water for at least 24 hours until pH is neutral. Once hydrogels are clean, they can be dried by two different means: on the one hand, the drying under an extraction hood followed by desiccator renders BC xerogels; on the other hand, the freezing of BC hydrogels with liquid nitrogen and incorporation into a freeze-dryer (Telstar Cryodos, -49 °C, 0,3 mbar) provides BC aerogels.

2.3 Characterization

The production rate in the different culture media have been carefully analysed and compared. To evaluate the properties of the BC xerogels and aerogels generated by drying BC hydrogels, four techniques have been applied:

2.3.1 X-Ray diffraction

A Bruker D8 Advance diffractometer was used, and data were processed with Topas 5.0 software. The source of the X-rays was a copper tube with a 40 kV acceleration voltage and a 40 mA current. Diffractograms were registered in intervals of 0,05° and 3 seconds of accumulation time, in a Bragg-Brentano methodology, in a range of $2\theta = [10-40^\circ]$.¹⁰ Diffractograms were processed with the Origin 9.1 software to compare the diffractometers, the crystallinity index (CI) was calculated from the relationship between the (200) peak intensity, $I_{(200)}$, and the valley of the amorphous cellulose, $I_{(am)}$:⁶

$$CI(\%) = \frac{(I_{(200)} - I_{(am)})}{I_{(200)}} \cdot 100$$

2.3.2 Thermogravimetric analysis

Samples were registered with a Netzsch TG 209F1 device in a nitrogen atmosphere. The heating ramp was 10°C/min from 30°C to 800°C.¹⁰ The thermal degradation profiles were evaluated

according to three parameters: the temperature of the degradation onset, the temperature of maximum degradation (T_{max}) and the final residue ratio (in %). This latter value can be related to the oxygen index (OI) and the flammability of the sample through the empirical Van Krevelen equation:¹¹

$$OI (\%) = 17,5 + 0,4 * (\%Residue)$$

A material can be considered flammable when $OI \leq 26\%$.

2.3.3 Swelling degree

With this procedure, the capability of water uptake exhibited by BC xerogels and aerogels was assessed. Samples were weighed in dry form and then immersed in water. The weighing was performed again (preceded by a gentle removal of the excess water) at intervals of 1 min, until reaching 15 min. From this point on, the weighing was made at 30 min, 1h and day by day until a stable and unchanged mass is recorded (meaning that the material has reached its maximum water uptake capacity). This maximum swelling degree was calculated with the following equation, in which m is the maximum mass and m_0 is the initial mass:

$$Swelling\ degree = \frac{m - m_0}{m_0} * 100$$

2.3.4 Scanning electron microscopy

Images of the surface microstructure and morphology were acquired with a JEOL-200FXII scanning electron microscope and collected in the secondary electrons mode. Given the electrically insulating nature of BC, it was necessary to cover its surface with a thin layer of gold (15 nm) prior to visualizing.

3. Results and Discussion

3.1 Influence of the drying methods

As stated above, from the produced BC hydrogels, one can obtain useful nanocellulose-based materials by drying these. The characteristics of such materials can be very dependent on the drying method, so in this section we illustrate such a fact. From the various possible drying methods which could be applied, we have focused in two specific ones: drying in ambient conditions (by aid of a fuming hood and a desiccator), and lyophilization (by aid of a freeze-drying device).

The as-obtained aerogels and xerogels were compared from the same culture conditions, in order to isolate the influence of the drying method. The biggest difference found was in the swelling degree (**Figure 1**), aerogels have about six times more water capacity than xerogels and are able to take a mass of water nearly 100 times its own weight. This aspect is determined by the lack of pore-filling fluid in xerogels, while in aerogels, the original porous structure of hydrogels is maintained, but these are filled with air. The porosity is also appreciable by SEM (**Figure 2**), in which the space among fibres within the aerogel is clearly seen, but in contrast, the xerogel fibres are visibly compact. In the real image samples (insets in Fig. 2), this aspect is also observed, aerogels are thicker and opaquer than xerogels. The obtained images are similar to other ones reported in literature with the same bacterial strain

or with *K. sucrofermentans*, but differ from other like the ones produced with *Gluconacetobacter hansenii* or *G. europaeus*.⁶⁻⁸ This evidences the influence of the bacterial strain on the microstructure of BC aerogels and xerogels.

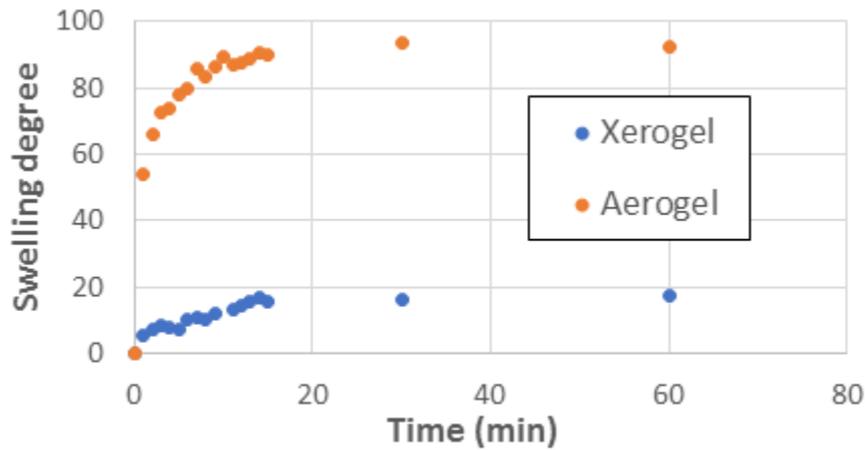


Figure 1. Swelling degree of a BC xerogel and a BC aerogel coming from the same hydrogel, cultured in optimal conditions, but dried differently.

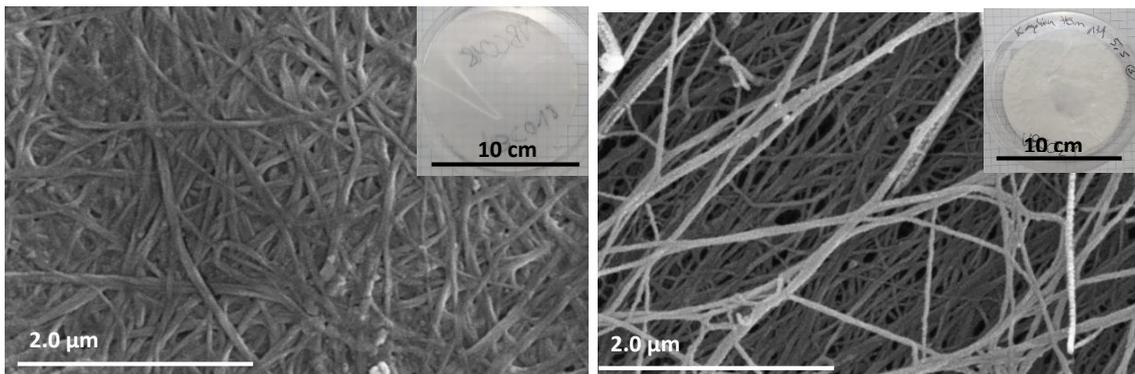


Figure 2. SEM images of a BC xerogel (left) and a BC aerogel (right). Insets show real photographs of these materials.

Differences in the thermal stability were noticed as well (**Figure 3**). According to their respective thermograms, BC aerogels generated less amount of solid residue upon heating than xerogels, but the degradation profile is very similar between both. The influence of the drying method in the percentage of residue can be critical as for the material's flammability. In Figure 3, xerogels are non-flammable (residue above 20wt%, hence $OI \geq 26\%$) and their lyophilized counterparts are mostly flammable (residue below 20wt%, hence $OI \leq 26\%$).

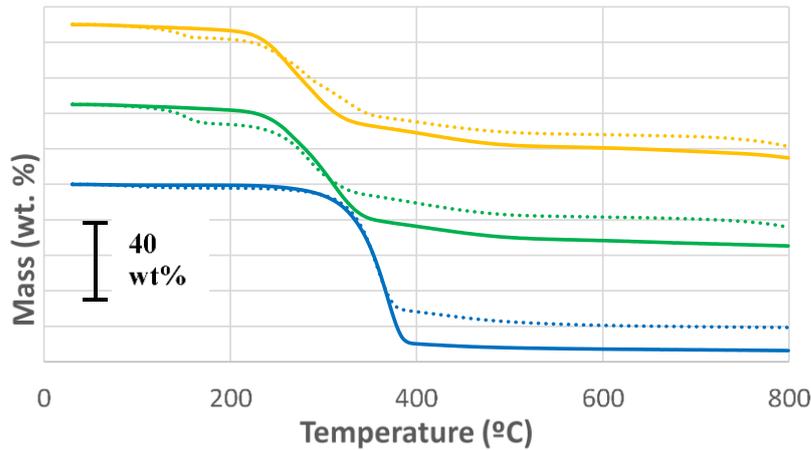


Figure 3. Thermograms, in a relative scale, of dried BC hydrogel samples (3 equivalent replicas of a given hydrogel). Solid lines correspond to aerogels, while dotted lines correspond to xerogels

The comparison between X-ray diffractograms of xerogels and aerogels displays also differences between both types of BC materials (**Figure 4**). The (110) crystalline plane is more intense in aerogels, as compared to xerogels, and the inverse trend is observed for the (1-10) plane. The CI is also different, slightly higher in xerogels (89,31%) than in aerogels (86,08%), being an indicative of the influence that the drying method may have on the ordering of the cellulose fibres. By comparing our XRD profiles with other ones from BC produced with different bacteria, such as *G. hansenii* or *Asaia bogorensis*, the relative intensity between the two main peaks is somewhat different.^{7,12} In other works similar CI values are found, but the same difference between aerogels and xerogels is not observed.⁶ In essence, the selected drying method of BC hydrogels coming from *K. xylinus* is of paramount importance to tailor the BC physical properties, being able to provide a specific water uptake capacity or thermal degradation and flammability profiles.

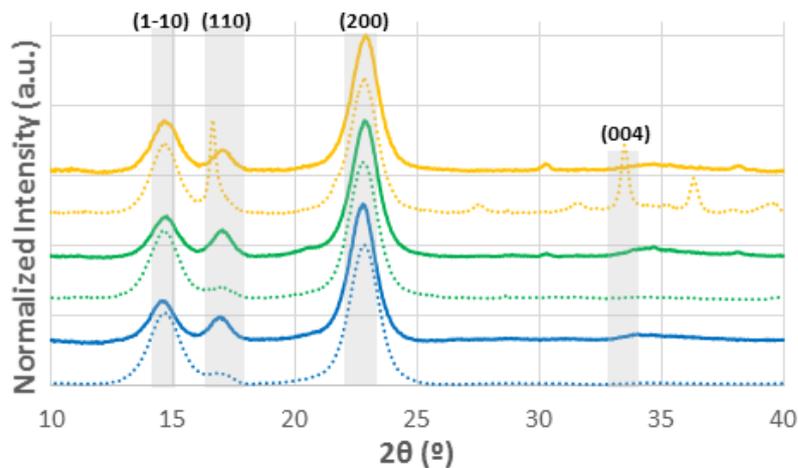


Figure 4. X-ray diffractograms, of dried BC hydrogel samples (3 equivalent replicas of a given hydrogel). Solid lines correspond to aerogels, while dotted lines correspond to xerogels. Miller planes are indicated by grey fringes.

3.1 Bacterial culture conditions

In general terms, the production of BC hydrogels was optimized by varying certain parameters, namely the medium pH, temperature, the carbon and the nitrogen source. By simple visual inspection, the amount and quality of hydrogels was taken as a representative feature to decide the most suitable values. The temperature influence was perfectly in accordance with the literature, in which 28-30°C provides an optimal production rate (less than 7 days per hydrogel piece),⁹ being the temperatures above (up to 36°C) and below this (up to 5°C) detrimental for the production (hydrogels produced in a time span of 14-21 days). The pH values were varied systematically from 4.4 to 7 (at a fixed temperature of 28-30°C) and the production rate of each hydrogel piece was more favorable at lower pH values: 5 days at pH = 4.4; 6 days at pH = 5-5.5; 6-7 days at pH = 6; and finally no appreciable BC production at pH = 7, this tendency is also observed elsewhere.¹³ As regards to the carbon source, no hydrogels were formed with lactose or sorbitol, while mannitol gave a low production rate (~10 days) and with a very low quality. The best carbon sources were glucose and saccharose, being the former even better than the latter. The best nitrogen source was a mixture of yeast extract and peptone (0.5% m/m each), while the mixture of yeast extract and ammonium sulfate was not as good as the former. For all these reasons, the best culture conditions, directed towards the best quality and highest yield BC hydrogels were chosen to be: glucose (4-5%), pH = 4.4, and yeast extract + peptone (0.5-1% each). Besides, the culture needs to be as static as possible, because the stirring of the culture medium prevents the formation of a consistent hydrogel. The bacterial culture in a medium with a small amount of ethanol was also tried and no appreciable change in the production rate was noticed, but conversely, a total loss of the production occurred when NaCl was introduced in the culture medium.

All the aforementioned statements are given for the optimal hydrogels production, but the possible influences of the bacterial culture conditions on the physical properties of the final materials (i.e. BC aerogels and xerogels) has hardly ever been explored.^{6,7,13} In the following sections, we attempt to compare the particular effects that the bacterial culture conditions may exert over the physical properties (thermal stability and crystallinity) of the resulting aerogels and xerogels.

3.2.1 Influence of the pH of the culture medium

The comparison of samples cultured at different pHs have been carried out using glucose as carbon source. The selected pH values are: 4.0, 5.5, 6.0 and 7.0, but as commented earlier, no hydrogel was produced at pH = 7.0 The higher production rate was observed at pH 4.4, in 5 days. Once these hydrogels were obtained, both aerogels and xerogels were produced from them and their respective characterization is analysed. In **Figure 5**, an example is given for BC xerogels, and it is visible that there aren't significant differences in their thermal degradation profile, concluding that pH doesn't have a clear influence in the thermal stability of the dried BC. A similar observation was inferred from BC aerogels (data not shown).

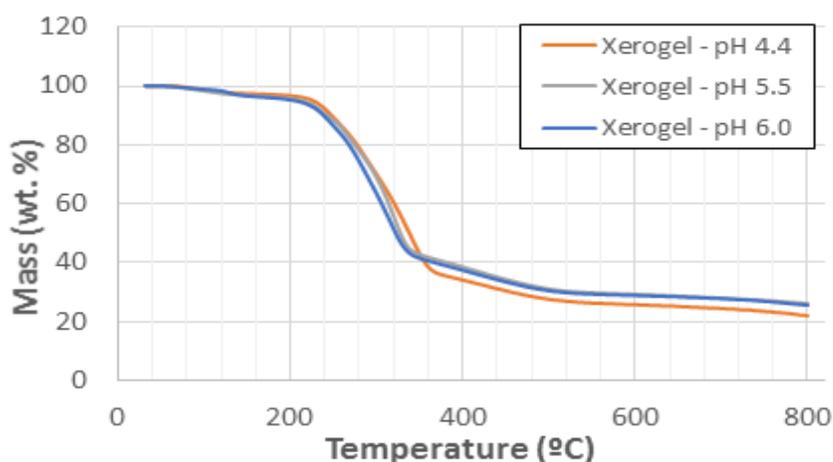


Figure 5. Thermograms of BC xerogel samples coming from hydrogels cultured at different pHs.

The same observation can be made when comparing the X-ray diffractograms (**Figure 6**), there aren't shifts in the position of the peaks and the normalized intensities are similar in all samples. However, the CI values are higher when the pH of the culture medium is increased, the average for pH = 6.0 is 91,47%, for pH = 5.5 is 88,45% and for pH = 4.0 is 88,00% so, it can be concluded that a higher pH, provides a higher CI to the dried BC, but it has a slower production rate.

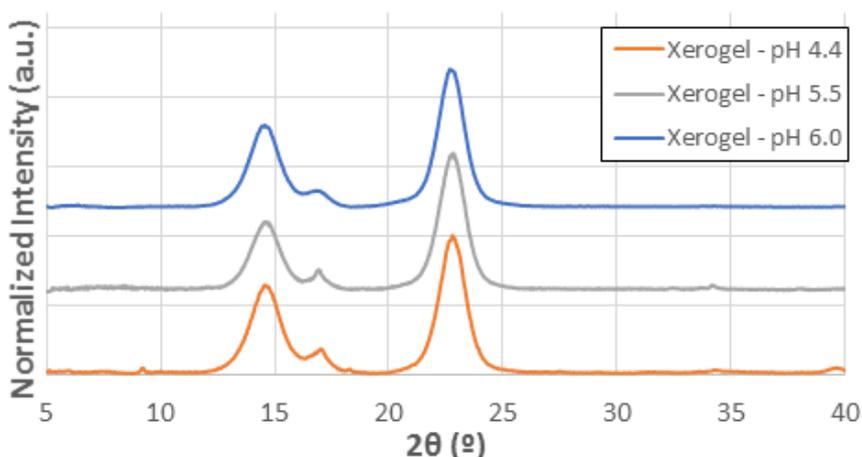


Figure 6. X-Ray diffractograms of BC xerogel samples coming from hydrogels cultured at different pHs.

3.2.3 Influence of the carbon source in the culture medium

This section is focused in the three carbon sources that provided a satisfactory production of BC hydrogels, namely glucose, fructose and saccharose. With these three sources, the hydrogels quality is apparently similar, but the production is faster with glucose (5 days per hydrogel piece), in contrast to the 6-7 days needed with fructose and saccharose.

The BC materials produced with fructose show a higher thermal stability, with a large upshift of about 50°C in the T_{max} value in comparison to the other carbon sources. The saccharose-

derived ones are a bit more stable than those from glucose, but this difference is small. This tendency is appreciated in both BC xerogels and BC aerogels, but as a matter of example only the latter are shown (**Figure 7**). The residue amount shows that fructose-derived dried samples have a smaller OI (22,9% with glucose and 27,3% with saccharose) making it flammable versus the others, which are not. In other words, fructose-derived dried BC materials show excellent thermal stability but a flammable behaviour, while the glucose- or saccharose-derived ones show lower thermal stability but a strong non-flammability. However, no clear trends or visible effects of the carbon source were noticed in the XRD profiles, nor in the CI values.

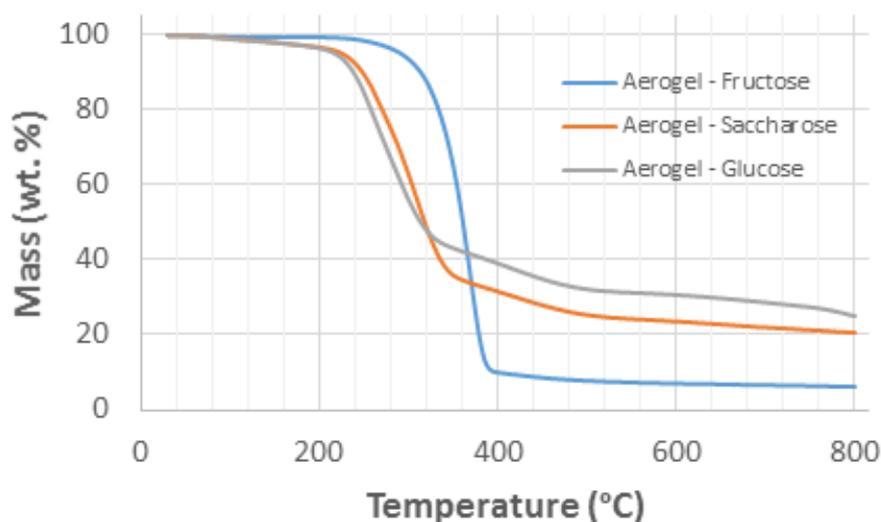


Figure 7. Thermograms of BC aerogel samples coming from hydrogels cultured with different carbon sources.

3.3 Application of optimized bc materials in water remediation

After having unravelled the effects that the bacterial culture conditions have, not only in the rate and quality of BC hydrogels production, but also in the eventual aerogels/xerogels derived from them after drying, we have attempted to apply them in a simulated application regarding safety, such as remediation of contaminated water. For this specific purpose, we have selected the optimized BC aerogels, as for their higher capacity to absorb water. Two cases have been studied: on the one hand, a small quantity of water in toluene (previously dyed with Sudan III) (**Figure 8**, top panel); and, on the other hand, an emulsion of dyed toluene into water (**Figure 8**, bottom panel). We observe a more pronounced and faster sorption effect in the case of the water in toluene, this happening because cellulose is a very hydrophilic material. A more modest, yet appreciable, effect is also observed in the case of the toluene-in-water emulsion, probably because the sorption of toluene is irreversible. This test reasserts the fact that BC aerogels are extremely useful for water-related applications, such as the drying of apolar solvents, water decontamination or the control of an organic spill. These applications can be studied from a nanotechnology and sustainable perspective, and have important repercussions in human safety, as regards to the management of drinking water and control over possible threats in this matter. To improve the efficiency it is possible to modify the BC to remove contaminants.¹⁴

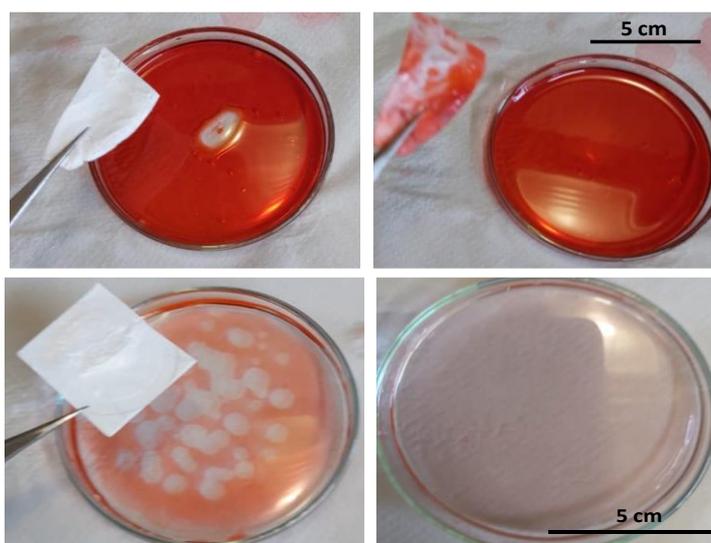


Figure 8. Sorption tests with a BC aerogel. Top panel, an impurified toluene with water; bottom panel, an emulsion of toluene in water. Left side images represent the starting point while right side images show the eventual result after soaking the hydrogel (few seconds in each case).

4. Conclusion

BC hydrogels production, coming from *K. xylinus*, have been optimized in terms of bacterial culture and subsequently tailored in their physical properties after drying. By rationally selecting the drying method, the properties that a BC hydrogel is able to exhibit can be controlled. In this regard, aerogels (obtained by lyophilisation) have a much larger sorption capacity and a higher porosity while xerogels (obtained by drying in open air) are more compact, as observed by SEM. Contrary to aerogels, BC xerogels are non-flammable. The pH of the culture medium does not have a great influence in the thermal stability of xerogels and aerogels, but it is important for the hydrogel production rate and slightly influent on the CI. The carbon source has a greater influence in the thermal stability of the final materials, being

fructose the one providing a higher thermal stability, but their dry materials are flammable; the other two carbon sources show an inverse trend as compared to fructose. The advantage of glucose over fructose and saccharose is its somewhat faster production rate.

The accomplishment of a sorption test demonstrates that BC aerogels, once optimized in production and physical properties, can be applied as an efficient sorbent, taking advantage of their porosity and hydrophilic character. There are other possible uses, such as filters to purify water, with critical implications in human safety and defence against chemical threats.

5. References

- (1) Shchipunov, Y. Bionanocomposites: Green Sustainable Materials for the near Future. *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84* (12), 2579–2607. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-05-04>.
- (2) Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. 14- Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources in Green Materials World. *J. Polym. Environ.* **2002**, *10* (April), 19–26. <https://doi.org/10.1023/A:1021013921916>.
- (3) Mekonnen, M. M.; Hoekstra, A. Y. Sustainability: Four Billion People Facing Severe Water Scarcity. *Sci. Adv.* **2016**, *2* (2), 1–7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500323>.
- (4) Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- (5) Esa, F.; Tasirin, S. M.; Rahman, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2014**, *2*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>.
- (6) Zeng, M.; Laromaine, A.; Roig, A. Bacterial Cellulose Films: Influence of Bacterial Strain and Drying Route on Film Properties. *Cellulose* **2014**, *21* (6), 4455–4469. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0408-y>.
- (7) Costa, A. F. S.; Almeida, F. C. G.; Vinhas, G. M.; Sarubbo, L. A. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* Using Corn Steep Liquor as Nutrient Sources. *Front. Microbiol.* **2017**, *8* (OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>.
- (8) Tsouko, E.; Kourmentza, C.; Ladakis, D.; Kopsahelis, N.; Mandala, I.; Papanikolaou, S.; Paloukis, F.; Alves, V.; Koutinas, A. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and By-Product Streams. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (7), 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.
- (9) Pourramezan, G. Z.; Roayaei, A. M.; Qezelbash, Q. R. Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* Sp. 4B-2. *Biotechnology* **2009**, *8* (1), 150–154. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.150.154>.
- (10) Gonzalez-Dominguez, J. M.; Ansón-Casaos, A.; Grasa López, L.; Abenia, L.; Salvador, A.; Colom, E.; Mesonero, J. E.; Garcia-Bordeje, J. E.; Benito, A. M.; Maser, W. K. Unique Properties and Behavior of Non-Mercerized Type-II Cellulose Nanocrystals as Carbon Nanotube Biocompatible Dispersants. *Biomacromolecules* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00722>.

- (11) González-Domínguez, J. M.; Ansón-Casaos, A.; Castell, P.; Díez-Pascual, A. M.; Naffakh, M.; Ellis, G.; Gómez, M. A.; Martínez, M. T. Integration of Block Copolymer-Wrapped Single-Wall Carbon Nanotubes into a Trifunctional Epoxy Resin. Influence on Thermal Performance. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (10), 2065–2075. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.008>.
- (12) Penttilä, P. A.; Imai, T.; Capron, M.; Mizuno, M.; Amano, Y.; Schweins, R.; Sugiyama, J. Multimethod Approach to Understand the Assembly of Cellulose Fibrils in the Biosynthesis of Bacterial Cellulose. *Cellulose* **2018**, *25* (5), 2771–2783. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1755-x>.
- (13) Soemphol, W.; Hongsachart, P.; Tanamool, V. Production and Characterization of Bacterial Cellulose Produced from Agricultural By-Product by Gluconacetobacter Strains. *Mater. Today Proc.* **2018**, *5* (5), 11159–11168. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.036>.
- (14) Fontana, J. D.; Koop, H. S.; Tiboni, M.; Grzybowski, A.; Pereira, A.; Kruger, C. D.; da Silva, M. G. R.; Wielewski, L. P. *New Insights on Bacterial Cellulose*; Elsevier Inc., 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811372-1.00007-5>.