

**Aislamiento de nanopartículas implementando membranas de celulosa
bacteriana en una matriz simulada.**

LAURA LILIANA MORE OSORIO

Programa Maestría en Ingeniería De Bioprocesos
Facultad de Ingeniería Ambiental y Civil
Universidad Antonio Nariño
Bogotá D.C.
2023

**Aislamiento de nanopartículas implementando membranas de celulosa
bacteriana en una matriz simulada.**

Laura Liliana More Osorio

Documento presentado como requisito para optar por el título de Magister en Ingeniería de
Bioprocesos

Directores:

Juan Daniel Valderrama Rincón
Ricardo Andrés Infante Matenzo

Programa Maestría en Ingeniería De Bioprocesos
Facultad de Ingeniería Ambiental y Civil
Universidad Antonio Nariño
Bogotá D.C.
2023

Aislamiento de nanopartículas implementando membranas de celulosa bacteriana en una matriz simulada.

Isolation of Nanoparticles Using Cellulose Bacterial Membranes in a Simulated Matrix.

More Osorio, Laura Liliana ¹; Valderrama Rincón, Juan Daniel ²; Infante Matenzo, Ricardo Andrés ³

¹ Universidad Antonio Nariño, Colombia, lmore91@uan.edu.co

² Universidad Antonio Nariño, Colombia, juan.valderrama@uan.edu.co

³ Universidad Antonio Nariño, Colombia, rinfante5@uan.edu.co

Resumen:

La celulosa es una molécula biológica que abunda en la naturaleza, obtenida de diversas fuentes, como plantas, hongos, bacterias y animales. Dentro de las bacterias Gram-Negativas, como *A. xylinum*, producen celulosa bacteriana, que se distingue por su pureza y propiedades biocompatibles, hipo-alérgicas y biodegradables, la celulosa bacteriana se ha utilizado en variadas aplicaciones, incluyendo el tratamiento de aguas residuales, purificación del aire y la creación de membranas selectivas. A pesar de estas propiedades, no se ha explorado su potencial en la obtención de estructuras y partículas nanométricas de origen bacteriano, las cuales pueden ser de gran interés biotecnológico y farmacéutico. Por eso, el presente trabajo tuvo como propósito la obtención y evaluación de una membrana de celulosa bacteriana con propiedades de filtración con el fin de aislar nanopartículas en una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos de donde se obtienen dichas moléculas; además, de proponer un protocolo que incluyó los tres pasos determinantes para la obtención de moléculas de este tipo: pretratamiento, aislamiento y recuperación, dando resultados significativos para la aplicación en matrices reales, lo que podría ser indicador de disminución en costos de producción y posible escalamiento.

Palabras claves: Celulosa bacteriana, membranas, filtración por membranas, microfiltración, nanofiltración.

Abstract:

Cellulose is a biological molecule that is abundant in nature, obtained from various sources such as plants, fungi, bacteria, and animals. Within Gram-Negative bacteria, such as *A. xylinum*, bacterial cellulose is produced, which is distinguished by its purity and biocompatible, hypoallergenic, and biodegradable properties. Bacterial cellulose has been used in various applications, including wastewater treatment, air purification, and the creation of selective membranes. Despite these properties, its potential in obtaining nanometric structures and particles of bacterial origin has not been explored, which could be of great biotechnological and pharmaceutical interest. Therefore, the present work aimed to obtain and evaluate a bacterial cellulose membrane with filtration properties to isolate nanoparticles in a matrix that simulates the conditions of bacterial cultures from which such molecules are obtained. In addition, it proposed a protocol that included the three crucial steps for obtaining molecules of this type: pretreatment, isolation, and recovery, yielding significant results for application in real matrices, which could be an indicator of reduced production costs and potential scaling up.

Key words: Bacterial cellulose, membranes, membrane filtration, microfiltration, nanofiltration.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	8
ESTADO DEL ARTE.....	10
MARCOS TEORICO.....	12
CELULOSA.....	12
CELULOSA BACTERIANA.....	13
Síntesis de celulosa bacteriana.....	15
Acetobacter xylinum.....	16
MEDIOS DE CULTIVO.....	17
TÉCNICAS DE FERMENTACIÓN.....	18
Cultivo estático.....	18
Cultivo agitación.....	19
Cultivo biorreactores.....	20
APLICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA EN DISTINTOS CAMPOS.....	21
FILTRACIÓN.....	22
FILTRACIÓN POR MEMBRANAS.....	22
OBJETIVOS.....	24
GENERAL.....	24
ESPECÍFICOS.....	24
METODOLOGÍA.....	25
1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de membranas ultrafiltración.....	25
Mantenimiento de la cepa de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	25
Evaluación de condiciones de cultivo.....	25
Desinfección y purificación de las membranas de celulosa bacteriana.....	26
Producción de celulosa.....	26
Pruebas de microfiltración y nanofiltración.....	27
2. Determinación de parámetros físico-mecánicos de las membranas ultrafiltración derivadas de celulosa bacteriana obtenidas.....	27
Determinación de la comprensibilidad de la película de celulosa.....	27

Determinación la capacidad de hinchamiento.....	27
SEM.....	28
Eficiencia de retención.....	28
Consumo de sustrato.....	28
3. Implementar las membranas obtenidas para el aislamiento de nanopartículas de un medio que simula la matriz de obtención de partículas de origen bacteriano.....	29
Preparación del medio de simulación para nanopartículas provenientes de origen bacteriano.....	29
Pretratamiento.....	29
Aplicación de membranas de ultrafiltración obtenidas en el aislamiento de nanopartículas implementando filtración al vacío.....	29
RESULTADOS Y ANALISIS.....	30
1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de membranas ultrafiltración....	30
2. Determinación de parámetros físico-mecánicos de las membranas ultrafiltración derivadas de BC obtenidas.....	38
Determinación de la compresibilidad e hinchamiento de la película de celulosa.....	38
SEM.....	39
Capacidad de filtración.....	41
Consumo de sustrato.....	42
3. Implementar las membranas obtenidas para el aislamiento de nanopartículas medio de un medio que simula la matriz de obtención de partículas de origen bacteriano.....	43
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES.....	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías Metabólicas del <i>A. xylinum</i>. CS:celulosa sintasa; FBP: fructosa bifosfatasa;FC:fructocinasa;F1FC: frustosa-1-p cinasa; FGI: fosfoglucoisomerasa; FGM:fosfoglucomutasa; FTS:fosfofructotransferasa; GC: glucocinasa; GP:glucosa permeasa; G6P-DH: glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP: uridin difosfato glucopirofosforilasa.	16
Figura 2. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes tiempos de incubación.	31
Figura 3. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes tiempos de incubación.	32
Figura 4. Pruebas de microfiltración. A. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 3; B. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 4; C. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 5.	33
Figura 5. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes fuentes de carbono	34
Figura 6. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes fuentes de carbono.	35
Figura 7. Pruebas de microfiltración. A. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado dextrosa 20 g/L; B. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado Sacarosa 10 g/L; C. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado .	36
Figura 8. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes concentraciones de inoculo.	37
Figura 9. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes concentraciones de inoculo	37
Figura 10. Pruebas de microfiltración. A. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,4%; B. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,6%; C. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,8%; D. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado.	38
Figura 11.SEM. A. SEM 0,6%; B. Distribución de tamaños de fibra 0,6%.	41
Figura 12. SEM. A. SEM 1%; B. Distribución de tamaños de fibra 1%.	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas de microfiltrado días de incubación	33
Tabla 2. Pruebas de nanofiltración tiempo incubación.	34
Tabla 3. Pruebas de microfiltrado fuentes de carbono.	36
Tabla 4. Pruebas de microfiltrado fuentes de carbono	39
Tabla 5. Pruebas de nanofiltración concentración inóculo.	40
Tabla 6. Comprensibilidad e hinchamiento membranas BC.	41
Tabla 7. Porcentaje de retención.	43
Tabla 8. Pretratamiento.	45
Tabla 9. Aislamiento de nanopartículas.	45
Tabla 10. Recuperación de nanopartículas.	46

INTRODUCCIÓN

La celulosa es la molécula biológica más abundante y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros en la tierra, siendo inclusive mayor que el de todos los biopolímeros juntos (Vandamme et al., 1998). Su estructura es lineal y está formada por la unión β -(1,4) de múltiples glucosas en cadenas no ramificadas, unidas entre sí con enlaces tipo puente de hidrógeno (Lima et al., 2015). La celulosa tiene una gran variedad de aplicaciones en distintas industrias como la papelera, textil, alimenticia, además de ser utilizada en la fabricación de explosivos, productos médicos y biotecnológicos, así como que en la fabricación de membranas usadas como agentes de separación (Carreño Pineda et al., 2012).

En la actualidad, la celulosa se puede adquirir de múltiples fuentes: 1) vegetales, por medio de la extracción de plantas leñosas (que posee un uso e importancia predominante industrialmente)(Gutiérrez et al., 2005); 2) de organismos provenientes de los reinos, fungi u hongo (*Dictyostelium*), bacteria (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) y animal (*Tunicidae*); 3) mediante síntesis enzimática en entorno controlado (Lee et al., 1994) y 4) a través de síntesis química controlada a partir de derivados bencílicos de glucosa (Nakatsubo et al., 1996).

Los productores más eficientes de celulosa de origen bacteriano son las bacterias Gram-Negativas, *Acetobacter xylinum* consideradas microorganismos modelo en los estudios básicos y aplicados sobre la producción de celulosa de origen bacteriano. Una de las características más importantes de la celulosa bacteriana es su pureza, que la distingue de la celulosa vegetal usualmente asociada a hemicelulosa y lignina (Carreño Pineda et al., 2012). La celulosa bacteriana purificada es hipoalergénica, biocompatible, biodegradable y no tiene efectos tóxicos o nocivos (Dubey et al., 2002). Dentro de su estructura, hay una formación de película, la cual funciona como mecanismo de flotación que le permite estar en interfase aire/líquido con mayor afinidad con el oxígeno (O₂). La molécula de celulosa dentro de las bacterias, es una barrera física que la protege de la radiación UV, aumenta su capacidad de colonizar e interactuar con sustratos y su carácter altamente higroscópico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato (Williams & Cannon, 1989).

La celulosa bacteriana (BC) es un material altamente versátil con una estructura microporosa en 3D que consiste en fibras entrecruzadas que forman una red compleja. Estas fibras y la estructura tridimensional dan lugar a una red de poros y espacios huecos retenidos que pueden variar en tamaño y distribución. La celulosa bacteriana tiene la capacidad de presentar modificaciones, que se ajustan a partir de parámetros experimentales desde su cultivo, tales como la fuente de carbono, tiempo de cultivo y concentración de inóculo (Gullo et al., 2018). Estas modificaciones en la estructura de la celulosa bacteriana hacen que sea un material de interés para aplicaciones de separación en soluciones acuosas; los poros y espacios huecos retenidos en su estructura permite adaptarlos en diversas técnicas de separación, como filtración, nanofiltración, diálisis, permeación por vapor y evaporación.

Actualmente se ha diversificado la investigación sobre las aplicaciones que las membranas de BC pueden tener, particularmente el aislamiento de macromoléculas como proteínas (Lehtonen et al., 2021), separación de medicamentos (Khan & Colvin, 1961), eliminación de factores como parásitos en muestras de sangre (Mkumbaye et al., 2017), entre otras, debido a su biocompatibilidad que ofrece ventajas en términos de costo, reutilización y tratamiento (Ma et al., 2019). El presente trabajo logró la obtención y evaluación de una membrana de nanofiltración de BC que se usó en el aislamiento de nanopartículas en una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos donde se producen moléculas de interés biotecnológico.

ESTADO DEL ARTE

El aumento e interés reciente en la investigación de biomateriales como la BC se debe a sus propiedades físico-mecánicas, la producción continua y pronta; por estas razones tiene múltiples aplicaciones, como agente microbiano, el tratamiento de aguas residuales, la purificación del aire y su aplicación como membrana para la separación de moléculas complejas de diferentes tamaños, entre otras. (M. Ahmad et al., 2015, Sun et al., 2022).

Las características físico-mecánicas de la BC le permiten funcionar en distintos campos, teniendo modificaciones que van desde las condiciones de cultivo, días de incubación, fuente de carbono y concentración de inóculo (Gullo et al., 2018). La fuente más recurrente de carbono utilizada para la producción de BC es la dextrosa (glucosa) característica del medio H-S; sin embargo, el rendimiento analizado de la producción de celulosa respecto al uso de otros azúcares como la sacarosa, evidencian un aumento considerable de la síntesis de celulosa (Embuscado et al., 1994), aumentando el espesor y la resistencia de membrana (Betlej et al., 2020). Otra de las fuentes comunes empleadas para la síntesis de BC es el sorbitol, el cual, es un alcohol de azúcar que a menudo se utiliza como fuente de carbono en el cultivo de bacterias productoras de celulosa; particularmente, algunas cepas de bacterias mejoran la síntesis de celulosa cuando se cultivan en medios que contienen sorbitol como fuente de carbono (Z. S. Ahmad & Munaim, 2018).

El uso de la BC como material de filtración va en ascenso, debido a la interacción que tiene con otros elementos, haciéndola selectiva con moléculas específicas de acuerdo a su naturaleza química, como colorantes, metales pesados, soluciones oleosas y grasas en aguas residuales (Troncoso & Torres, 2020) Algunos estudios han mostrado que la unión de BC con óxido de grafeno, da como resultado, la formación de un filtro con alta resistencia mecánica, estable en el agua y selección iónica alta, demostrando así que los filtros BC fueron capaces de eliminar el 99% del naranja de metileno de las aguas residuales junto con metales pesados, dando un valor de eliminación del 50% de cobre (Urbina et al., 2018). Al incorporar Dióxido de Titanio (TiO_2), la filtración bacteriana de la membrana nanocompuesta para el tratamiento de aguas residuales mejora considerablemente respecto a las condiciones previas (Suryanto et al., 2023).

Otras investigaciones han usado membranas de BC nativas (no tienen ningún de tratamiento o manipulación), lo que estableció las 3 condiciones referentes (porcentaje de inóculo, días de incubación y fuente de carbono) a la conformación 3D de la BC indican el aumento o disminución de la densidad y/o el tamaño de los poros; procesos de purificación de soluciones de suero bovino, indicaron un porcentaje de retención entre el 67% y el 99% (Krystynowicz et al., 2000). La separación de polioles, clarificación de jugo de frutas (Pandey et al., 2005), evaporación de mezclas etanol-agua (Dubey et al., 2002; Tiongson et al., 2002), eliminación de componentes aromáticos de frutas (Shibazaki et al., 1993), diálisis (George et al., 2005; Sokolnicki et al., 2006), permeación de gases (Clasen et al., 2006; Lima et al., 2015) y la eliminación de microplásticos de aguas residuales (Betlej et al., 2020) son ejemplos de los usos de la BC.

Las características físico-mecánicas que presenta la BC, como son su pronta y rápida obtención, la hacen rentable para su implementación y reutilización; aún no se ha documentado su uso en el aislamiento y purificación de nanopartículas de origen bacteriano con interés biotecnológico y farmacéutico que optimice los procesos, disminuyendo costos y su posible escalamiento. El presente trabajo logró la obtención y evaluación de una membrana de nanofiltración de BC que se usó en el aislamiento de nanopartículas en una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos donde se producen moléculas de interés biotecnológico.

MARCO TEORICO

CELULOSA

La celulosa, el polímero de mayor incidencia en la naturaleza y un componente fundamental de la biomasa de plantas (Zakaria & Nazeri, 2012), es un componente estructural intrínseco (en forma de microfibrillas de 2 a 20 nm de diámetro y de 100 a 40,000 nm de largo) que forma una red siendo el mayor componente de la pared celular de las plantas. (Ortiz & Hernández, 2004). Su estructura química está conformada por un polímero lineal compuesto por unidades repetitivas de glucosa, unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ - D- glucopiranosos, estos enlaces se forman por la unión entre el radical -OH del carbono hemiacetalico (carbono que porta el grupo aldehído o el cetónico en la fórmula lineal del monosacárido) y el grupo alcohol de otro monosacárido, con pérdida de una molécula de agua (Campbell et al., 2004).

La celulosa ha sido utilizada industrial y comercialmente en la fabricación de papel, textiles, materiales de construcción, explosivos (como nitrocelulosa), películas (en forma de acetato de celulosa), los alimentos y azúcares fermentables; dando apertura a aplicaciones en medicina, estudio de tejidos y biotecnología (Czaja et al., 2006; Carreño Pineda et al., 2012).

En la actualidad, la obtención de celulosa se ha diversificado, permitiendo acceder a este polímero desde múltiples fuentes; su fuente primaria es la celulosa vegetal, la cual es extraída de plantas leñosas, destacada por su amplio uso e importancia industrial (Gutiérrez et al., 2005). Sin embargo, se ha identificado en organismos de los diferentes reinos, como hongos (*Dictyostelium*), bacterias (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) y animales (*Tunicidae*). Además, se puede sintetizar a partir de actividad enzimática en un entorno controlado (Lee et al., 1994) o, a través de síntesis química controlada de derivados bencílicos de glucosa (Nakatsubo et al., 1996). La variedad de fuentes, ofrecen alternativas en la adquisición de celulosa y son oportunidades para ampliar las aplicaciones en los diferentes sectores.

CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana es un polímero extracelular sintetizado por bacterias en mayor proporción del género *Acetobacter*. La celulosa producida desde cualquier fuente, incluyendo la BC, es un polímero de residuos de glucosa unidos por enlace covalente entre el carbono 1 y el 4 ($\beta(1-4)$)

formando una cadena lineal que se asocian por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, difíciles de hidrolizar en solventes orgánicos, ácidos concentrados como (el ácido fosfórico 85% v/v, ácido sulfúrico 72%v/v, ácido clorhídrico 40% v/v y sales inorgánicas (sales de cadmio y etilendiamino) (H.-I. Jung et al., 2010). La formación de cadenas, forman estructuras denominadas “microfibrillas” de celulosa, que se caracterizan por contar con una polaridad unidireccional y un grosor variable (Chávez-Pacheco & Martínez-Yee, 2004).

Los productores más eficientes de celulosa son las bacterias Gram-Negativas del género *Acetobacter*, *Acetobacter xylinum* (reclasificadas como *Gluconoacetobacter xylinus*), las cuales son usadas como microorganismos referentes o modelos en los estudios detallados sobre la BC. Diferentes investigaciones muestran que su composición química es idéntica a la de la celulosa de origen vegetal, aunque presenta cambios significativos respecto a su conformación estructural y propiedades físicas (J. Y. Jung et al., 2005; Keshk, 2006). Una de las características de la BC es su pureza, que la distingue de la celulosa vegetal usualmente asociada a hemicelulosa y lignina, otra de sus propiedades. es grado alto de cristalinidad (mayor a 60 %); cristales compuestos de celulosa tipo I α y I β , la relación entre las dos formas cristalinas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura) (Campbell et al., 2004). La celulosa bacteriana tratada y purificada, no genera alergia y toxicidad, convirtiéndose en alergénica, bio-compatible y biodegradable (Dubey et al., 2002).

El mecanismo de cristalización de las microfibrillas en *Khomagaither xylinus* tiene origen en dos aloformas de celulosa: 1) si las microfibrillas se orientan en forma paralela, se sintetiza celulosa I; mientras que si 2) el arreglo es antiparalelo se obtiene celulosa II. La aloforma predominante en la naturaleza es la celulosa I; no obstante, bajo ciertas condiciones se sintetiza celulosa II; la celulosa, producida industrialmente se caracteriza por dar lugar a otras formas aloformas denominadas celulosa III y IV, diferenciadas por su estructura cristalina (H.-I. Jung et al., 2010).

La microestructura de la BC es formada por microfibrillas con un diámetro de 4 a 7 nm y un grado de polimerización de 2,000 hasta 14,000 moléculas de glucosa; las microfibrillas a su vez cristalizan en paquetes y cintas, las cuales alcanzan un grosor de 1 a 9 μ m y dar origen a una extensa estructura reticulada estabilizada por puentes de hidrógeno; la condensación de las cintas da como resultado la estructura tridimensional BC (Zeng et al., 2011). Macroscópicamente, la

celulosa bacteriana está ligada a las condiciones de cultivo, dichas condiciones, cuando son estáticas, da origen a una capa o estructura superficial que se asemeja a una "película" o "nata" en la interfase aire-líquido, la bacteria libera microfibrillas de forma continua, las cuales cristalizan en cintas y se superponen formando planos paralelos (Ha & Park, 2012). En cambio, un cultivo con agitación, se obtiene un menor grado de agrupamiento, una disminución en la cantidad de planos paralelos y se forman gránulos de BC irregulares, así como cadenas fibrosas o ramificadas (Chávez-Pacheco & Martínez-Yee, 2004).

Síntesis de celulosa bacteriana

La síntesis de celulosa se lleva a cabo en dos fases. La primera, la fuente de carbono es convertida en uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), que actúa como sustrato esencial en la producción de celulosa y la segunda, la formación de celulosa y su posterior liberación en el medio de cultivo (Czaja et al., 2006; Carreño Pineda et al., 2012). La primera fase, ingresa el sustrato a la célula, el cual es convertido a glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa; posteriormente, la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. El siguiente paso, la glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG-pirofosforilasa; finalmente, por la acción de la enzima celulosa-sintasa, polimeriza la glucosa, dando origen a la celulosa (Ross et al., 1991; Han & Robyt, 1998).

La segunda etapa es la polimerización de la glucosa y excreción de celulosa al medio de cultivo, la *K. xylinus* posee una serie de poros de 3.5 nm alineados sobre el diámetro de la membrana celular, en la cara interna de la membrana se encuentra el complejo enzimático celulosa-sintasa rodeando cada uno de los poros; la celulosa es secretada al medio como una subfibrilla elemental de 1.5 nm de diámetro; al agrupar las subfibrillas se forma una microfibrilla que se empaqueta produciendo las fibras y cintas de celulosa (Marx-Figini & Pion, 1974).

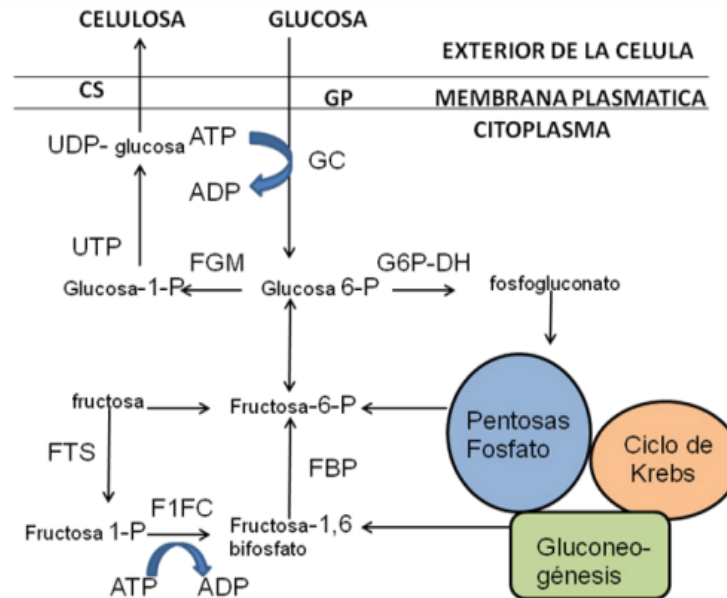


Figura 1. Vías Metabólicas del *A. xylinum*. CS:celulosa sintasa; FBP: fructosa bifosfatasa;FC:fructocinasa;F1FC: frustosa-1-p cinasa; FGI: fosfoglucoisomerasa; FGM:fosfoglucomutasa; FTS:fosfofructotransferasa; GC: glucocinasa; GP:glucosa permeasa; G6P-DH: glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP: uridin difosfato glucopirofosforilasa.

La velocidad de crecimiento de las fibrillas se ve afectada por factores, como la escasez de nutrientes y la disminución de la actividad enzimática, debido al envejecimiento celular (Hwang et al., 1999). Finalmente, por cada tres moléculas de glucosa, se oxida una completamente, mientras que los dos restantes se convierten en celulosa (Ortiz & Hernández, 2004). El complejo celulosa-sintasa presente en *A. xylinum* está integrado por cuatro subunidades de distintos pesos moleculares, y su información genética se encuentra codificada en el operon bcs (Hestrin & Schramm, 1954).

Acetobacter xylinum

A. xylinum, también conocido como *G. xylinus*, es un microorganismo gramnegativo con forma de bastón. Presenta una longitud en el rango de 2 a 10 μm y un ancho de 0,5 a 1 μm . Requiere oxígeno para su supervivencia y puede producir ácido a partir de glucosa, alcohol etílico y alcohol propílico en lugar de oxidar ácidos en presencia de oxígeno. Destaca por su habilidad para polimerizar glucosa en celulosa en un solo proceso de síntesis. Estas bacterias, conocidas como bacterias del ácido acético, normalmente se presentan en cadenas cortas de 6 a 8 células. *A. xylinum* muestra resistencia a cambios abruptos en la composición del medio, disminución de

agua, variaciones de pH, presencia de sustancias tóxicas y patógenos. A pesar de condiciones climáticas adversas, puede crecer y producir celulosa. Tras el tratamiento con radiación UV, el 23% de las células recubiertas de celulosa sobreviven. La eliminación de la celulosa protectora reduce drásticamente la supervivencia bacteriana al 3% (Vandamme et al., 1998).

MEDIOS DE CULTIVO

Comercialmente hay disponible una variedad de medios para la producción de BC, es importante identificar las condiciones óptimas que permitan lograr una productividad alta en la fermentación, *A. xylinum*, el microorganismo modelo de este proceso, requiere un suministro regulado de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y otros elementos para llevar a cabo la biosíntesis de celulosa (Desai et al., 2006). Los medios de fermentación para la biosíntesis de BC se clasifican en dos categorías: medios sintéticos o químicamente definidos, y medios complejos o indefinidos; los medios químicamente definidos contienen sustancias químicas en (Hussain et al., 2019) concentraciones conocidas, mientras que los no definidos tienen componentes de fuentes naturales en concentraciones desconocidas (J. Zhang & Greasham, 1999). El medio H-S es el medio químicamente definido más utilizado para la producción de BC, ya que su producción y costo son determinantes en la industria. Los reportes sobre producción se han llevado a cabo en medios que contienen sustancias químicas como fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, fructosa, manitol y arabitol), nitrógeno complejo y fuentes de vitaminas como extracto de levadura y polipeptona (Phulara et al., 2019).

Varios medios han sido usados para la producción de BC, ejemplos de ellos son, medio HS-ácido ascórbico (HSA), medio Hassid-Barker (HB), medio Yamanaka, medio Zhou, medio Son, medio Park, medio M1A05P5, caldo súper óptimo con represión de catabolitos (SOC), medio CSL-fructosa (CSL-Fru), medio de fermentación (FM), medio extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD), medio tamponado con acetato (AB), medio HS modificado (MHS), medio Joseph, medio fructosa-medio de solución sólida macerada de maíz (fru-CSS) y medio HS alterado (AHS). Se ha informado que el medio de licor macerado de melaza y maíz es un medio complejo adecuado para la producción rentable de BC sin la necesidad de costosas suplementaciones con fuentes de nutrientes (Sperotto et al., 2021).

TÉCNICAS DE FERMENTACIÓN

La producción de BC es posible por medio de tres métodos tradicionales que incluyen cultivos estáticos, agitados/agitados y dentro de biorreactores; la morfología macroscópica, la microestructura y las propiedades resultantes del BC cambian (Wang et al., 2019). El método de cultivo estático da como resultado la acumulación de una membrana gelatinosa de celulosa en la superficie de la solución nutritiva (Rani & Appaiah, 2011), mientras que el cultivo agitado/agitado produce resultados en forma de asterisco, esfera, gránulos o masas irregulares (Watanabe et al., 1998). La selección del método se establece a partir de las aplicaciones finales del BC, así como de las características físicas, morfológicas y mecánicas requeridas (Wang et al., 2019).

Cultivo estático

El método de cultivo estático es tradicional para la producción de BC y ha sido usado como referencia. En este método, los recipientes se llenan con una solución nutritiva fresca y se incuban durante 1 a 14 días a una temperatura y un pH adecuados, de 28 a 30 °C y $4 < \text{pH} < 7$. El BC producido mediante el método de cultivo estático es una lámina de hidrogel con estructura y propiedades aprovechables (Lahiri et al., 2021). En los primeros estadios, según los estudios realizados, el microorganismo experimenta un aumento en su población, gracias al consumo de oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo. Durante esta fase inicial, el microorganismo sintetiza una determinada cantidad de celulosa dentro del medio líquido. Es importante destacar que solo las bacterias que se encuentran cerca de la interface aire/medio de cultivo y tienen acceso al oxígeno pueden mantener su actividad y producir celulosa en forma de capas superpuestas (Carreño Pineda, 2011).

El espesor de la membrana BC es directamente proporcional al tiempo de cultivo, ya que la membrana se forma en la superficie de la solución nutritiva, la producción de BC está relacionada con el área de superficie de la interfaz aire-líquido. Las subfibrillas de celulosa se extruyen continuamente en poros continuos linealmente en la superficie de *A. xylinum* y cristalizan en microfibrillas, formando planos paralelos aleatorios; posterior a ello, la celulosa se ensambla formando una membrana espesa en la superficie del medio, generando redes 3D porosa (Krystynowicz et al., 2002).

Cultivo agitación

Durante las fermentaciones en cultivo agitado, es posible obtener pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de fibras, cuya formación está definida por el diseño del reactor y las condiciones operativas utilizadas; estos cultivos pueden llevarse a cabo en lotes o de manera continua, utilizando reactores de tanque agitado o airlift (Chávez-Pacheco & Martínez-Yee, 2004). La disponibilidad de oxígeno está directa con la producción de BC y representa un desafío significativo en el método de cultivo estático. No obstante, se ha comprobado que un exceso en el suministro de oxígeno conlleva una disminución en la formación de BC. El concepto fundamental que dio las condiciones del cultivo agitado fue la mejora u optimización en la entrega de oxígeno a las bacterias durante el cultivo (Wang et al., 2019). Sin embargo, se observó que incrementar la tasa de suministro de oxígeno a los medios de cultivo, tanto la agitación/sacudida como el cultivo estático resultaron en una producción similar de BC durante un lapso equivalente. Adicionalmente, la literatura ha reportado una menor producción de BC utilizando el método de cultivo agitado/sacudida en comparación con el cultivo estático (Czaja et al., 2004).

El tamaño y la forma del BC están influenciados de manera directa por la velocidad de rotación, la duración del cultivo y los aditivos presentes en el medio de cultivo (Watanabe et al., 1998). La agitación rotacional y la fuerza de corte constante durante el cultivo agitado son los principales factores que contribuyen a la formación de una estructura esférica. Además, se ha descubierto que la concentración de bacterias puede incidir en el tamaño y la cantidad de BC con forma esférica; una concentración bacteriana más alta puede llevar a la producción de un mayor número de esferas de BC (Hu et al., 2013). Otra de las fallas de esta técnica, es la posible aparición de un mutante no productor de celulosa por la inestabilidad genética de las bacterias en condiciones de agitación, lo que puede reducir la productividad de BC (Huang et al., 2014).

En general, el método de agitación presenta ciertas dificultades, como la inestabilidad celular, el comportamiento no newtoniano durante la mezcla del BC y la aplicación de altas fuerzas de corte, por lo que el BC obtenido a través del cultivo agitado muestra cambios en su microestructura y propiedades, incluyendo un menor grado de polimerización, una cristalinidad reducida y propiedades mecánicas menos óptimas, la microestructura del BC con forma esférica,

difiere de la producida por otros métodos de cultivo debido a la influencia de la agitación en el proceso de formación de BC (Kouda et al., 1996; Kouda et al., 1998).

Las geometrías de BC con forma de esfera varían sustancialmente entre los cultivos estáticos y los agitados/sacudidos. En el cultivo estático, hay una membrana de BC en la interfaz aire-líquido del nutriente, mientras que en el cultivo agitado/agitado, el BC se produce desde el centro de la partícula y se expande hacia el exterior, dando lugar a una estructura en capas en su microestructura. La región interior del BC con forma de esfera se encuentra hueca, con fibras de BC más densas detectadas dentro de estas capas, las cuales también contienen cepas bacterianas (Yang Hu & Jeffrey M Catchmark, 2010). Estos desafíos, y algunas publicaciones han indicado que el cultivo agitado podría ser la técnica más adecuada para la producción a gran escala desde una perspectiva económica (Hu et al., 2013).

Cultivo biorreactores

Para superar los desafíos inherentes a la producción a gran escala y expandir las aplicaciones del BC, era crucial establecer un proceso de producción rentable con altos niveles de productividad, bajos costos y tiempos de cultivo reducidos. Una estrategia efectiva para aumentar la producción de BC es emplear cultivos continuos con una alta tasa de transferencia de solución nutritiva u oxígeno. Se ha documentado que ciertos cultivos en biorreactores logran elevadas tasas de producción de BC. Estudios recientes sobre el proceso de fermentación y la tecnología de preparación de BC, han presentado diversos enfoques utilizando biorreactores, dichos biorreactores pueden ser caracterizados por su modo de operación, tales como la producción de BC con aire enriquecido en oxígeno con el uso de discos giratorios o a través del soporte de biopelícula (Campano et al., 2016; Huang et al., 2014).

Con el fin de aumentar el suministro de oxígeno, se usaron dos tipos de biorreactores: los de tanque agitado, con la desventaja de un elevado consumo energético, y los de transporte aéreo, conocidos por su mayor eficiencia energética y reducción de la tensión de corte en comparación con los primeros. No obstante, la BC producida en estos biorreactores aéreos suele exhibir propiedades mecánicas, cristalinidad y grado de polimerización bajos. (Chao et al., 1997). Otra alternativa es reactores de columna de burbujas de tipo puente aéreo modificado, que ha demostrado una alta productividad en la producción de BC. No obstante, la BC resultante suele

tener propiedades mecánicas y características de polimerización menos óptimas (Blanco Parte et al., 2020).

En 2002 se introdujo la preparación de BC mediante un biorreactor de disco giratorio, en la búsqueda de obtener una estructura de BC homogénea; en este tipo de biorreactor, los discos circulares giran mientras sus superficies interactúan alternativamente con aire y medios líquidos. Aunque el rendimiento no superó significativamente al del cultivo estático, se observó que la adición de compuestos plásticos al biorreactor incrementó la productividad, permitiendo una producción semicontinua de BC, mostrando el posible potencial para su aplicación comercial y su escalamiento (Mormino & Bungay, 2003). Otro tipo de biorreactor implementado es el de lecho percolador acoplado con una capacidad de transferencia de oxígeno enriquecida para fomentar la formación de BC durante la fermentación. Comparado con los métodos de cultivo como el estático y agitado, el reactor de lecho percolador proporciona una alta concentración de oxígeno y una baja fuerza de corte, generando BC con excelentes propiedades, como alto grado de asociación -OH, alta polimerización, pureza, capacidad de retención de agua, porosidad y estabilidad térmica (Lu & Jiang, 2014).

APLICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA EN DISTINTOS CAMPOS.

La BC es utilizada en diversos ámbitos como medicina, alimentos y tecnología debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, absorción de agua y porosidad. A nivel comercial, se utiliza en productos como Biofill para cubrir heridas y Gengiflex para implantes dentales. En Filipinas, se emplea para producir "nata de coco". También se utiliza en transductores acústicos debido a su alta resistencia mecánica tras un tratamiento químico. En el ámbito médico, se investiga su uso como sustituto temporal de piel para tratar heridas, quemaduras y úlceras; el uso de BC modificadas con nanopartículas de plata con propiedades antimicrobianas eficaces para la protección de heridas.

Diversas investigaciones han examinado el uso de membranas de BC en procesos de filtración. Por ejemplo, se han evaluado estas membranas para la permeación de soluciones de suero bovino, encontrando un porcentaje de retención entre el 67% y el 99% (Krystynowicz et al., 2000). Estas membranas también se han aplicado en la separación de polioles, clarificación de jugo de frutas (Pandey et al., 2005), pervaporación de mezclas etanol-agua (Dubey et al., 2002;

Tiongson et al., 2002), pervaporación de componentes aromáticos de frutas (Shibazaki et al., 1993), diálisis (George et al., 2005; Sokolnicki et al., 2006), y permeación de gases (Clasen et al., 2006; Lima et al., 2015). En todos estos casos, las membranas demostraron selectividad para los componentes estudiados. No obstante, uno de los desafíos principales radica en que, en la mayoría de los procesos de separación, el flujo de permeado suele ser bastante bajo.

FILTRACIÓN

La filtración es el proceso mediante que genera la retención de partículas presentes en líquidos utilizando objetos o estructuras filtrantes que capturan los sólidos, ya sea en su superficie o en su interior (Barraque et al., 1979). Existen dos tipos principales de filtración: la filtración en medio granular y la filtración superficial. La filtración en medio granular implica que los sólidos o partículas se retienen dentro del material filtrante o pueden eliminarse en la superficie. Por otro lado, la filtración superficial se lleva a cabo utilizando materiales porosos, como las membranas (Suárez Díez, 2014).

FILTRACIÓN POR MEMBRANAS

La filtración por membrana es un método de separación física basado en diferencias de tamaño y características moleculares. Utiliza membranas con diferentes tamaños de poros como barrera física, y la fuerza impulsora es debida a la diferencia de presión a través de la membrana (Le-Clech et al., 2006). Una membrana se define como una película ligera que actúa como una barrera selectiva, dividiendo dos fases, y desempeña un papel crucial en el proceso de separación de componentes (Ciardelli et al., 2001). La finalidad es facilitar el paso de uno de los componentes de la mezcla mientras se bloquea la permeación de otros compuestos (Nunes & Peinemann, 2001). Las membranas pueden clasificarse principalmente según su tamaño de poro y su capacidad para retener o permitir el paso de ciertas sustancias. Sin embargo, también se puede clasificar según su naturaleza, su composición química y estructura.

Clasificación de membranas según tamaño de poro

Según el tamaño del poro, las membranas se pueden clasificar en: osmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración, electrodiálisis y microfiltración. Las membranas de microfiltración separan partículas con un tamaño comprendido entre 0,05 y 10 μm , usualmente, se usa para

retener sólidos en suspensión, empleándose en etapas de limpieza, de concentración o como pretratamiento para la nanofiltración o la ósmosis inversa (Ibáñez Lorente, 2007). La membrana de ultrafiltración concentra grandes moléculas y macromoléculas de peso molecular entre 1000 y 200,000 Da; se estima que tiene un diámetro aproximado de poro de $0,01\mu\text{m}$ (Rosenberg, 1995). La membrana de osmosis inversa concentra soluciones por eliminación de agua; el tamaño del poro se encuentra entre 5 - 15 Å permitiendo obtener retenidos con un contenido máximo de sólidos del 30 % (Villalobos, 2006). Las membranas de nanofiltración son capaces de separar partículas con diámetro de poro inferior a $0,001\mu\text{m}$ (1nm), retiene lactosa y otros componentes de gran tamaño, permitiendo permear solo iones minerales monovalentes y agua (dos Reis Coimbra & Teixeira, 2016). Por último, las membranas de Electrodialisis son capaces de separar iones cargados eléctricamente, mediante la aplicación de un campo eléctrico (dos Reis Coimbra & Teixeira, 2016).

Clasificación estructural de membranas

Las membranas se pueden categorizar según su estructura interna en dos tipos principales: porosas y densas, y según su configuración en simétricas y asimétricas. Las membranas densas no muestran poros observables mediante técnicas de microscopía electrónica, aunque se presume que pueden tener agujeros con diámetros estimados entre 10 y 20 Å. Ejemplos de este tipo de estructuras son las encontradas en las membranas de ósmosis inversa y nanofiltración. Por otro lado, las membranas porosas presentan aberturas con diámetros superiores a 20 Å características de las membranas microfiltración y ultrafiltración, estas membranas a su vez se subdividen en homoporosas cuando sus poros tienen un tamaño uniforme, o heteroporosas cuando tienen distintos diámetros. Las membranas porosas tienen configuración simétrica cuando su matriz es sólida y homogénea. Por otro lado, son asimétricas cuando presentan dos componentes: una capa selectiva y un sustrato poroso que actúa como soporte. La asimetría puede ser homogénea si la membrana tiene un mismo material en toda su estructura o no homogénea cuando el soporte poroso y la capa selectiva son de naturaleza diferente (Ortiz & Hernández, 2004).

Clasificación de membranas según su constitución

Las membranas también se clasifican según su composición en dos categorías principales: Membranas inorgánicas, como las de cerámica, las cuales exhiben una mayor estabilidad química, térmica y mecánica, aunque suelen tener un costo elevado y membranas orgánicas,

están compuestas principalmente por polímeros, como la celulosa y sus derivados; estas membranas suelen ser hidrofílicas de costos accesibles. Dentro de los polímeros se encuentran las poliamidas, las cuales son químicamente estables, aunque presentan la desventaja de no tolerar exposiciones prolongadas y experimentar degradación rápida, también se utilizan polisulfonas y poliéstersulfonas, que son membranas hidrofílicas, principalmente en procesos de ultrafiltración y como soporte para otras membranas (Soriano Bartolo, 2001).

OBJETIVOS

GENERAL

Generar y evaluar membranas de nanofiltración a partir de celulosa bacteriana para el aislamiento de nanopartículas de una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos generadores de moléculas de interés biotecnológico.

ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de membranas nanofiltración.
2. Caracterizar membranas nanofiltración derivadas de celulosa bacteriana obtenidas en relación con sus propiedades físico-mecánicas.
3. Evaluar las membranas obtenidas para el aislamiento de nanopartículas de un medio que simula la matriz de un cultivo para obtención de partículas de origen bacteriano.

METODOLOGÍA

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de membranas ultrafiltración.

Mantenimiento de la cepa de *Komagataeibacter xylinus*

Se inocularon colonias de *G. xylinum* en 250 ml de medio H-S en un Erlenmeyer, encubadas a 30 °C durante 24 h. La fermentación se llevó a cabo inoculando 1% de caldo de cultivo en medios estándar (H-S). El cual era renovado cada 20 días para la obtención de inóculo activo fresco (Khattak et al., 2015).

Evaluación de condiciones de cultivo.

Día de incubación

La producción de BC se evaluó con diferentes tiempos de incubación. Aquí, se midieron tres diferentes tiempos de incubación del día 3 al día 5. Se inocularon colonias de *A. xylinum* en 50 ml de medio H-S en un matraz Erlenmeyer de 250 y encubadas a 30 C durante 24 h. La fermentación se llevó a cabo inoculando 1 % de caldo de cultivo en medio estándar (H-S). En un erlenmeyer de 250 ml, se mezclaron homogéneamente y se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con la suspensión de estera de celulosa (aproximadamente 1%) y los matraces se incubaron a 30 °C.

Fuente de carbono

La producción de CB se evaluó con diferentes sustratos. Aquí, la glucosa fue reemplazada por sacarosa 20 g/L y sorbitol 20 g/L y una modificación del H-S de la concentración de dextrosa 10 g/mL. Se utilizó medio H-S como control para la producción de BC. estos medios se mezclaron homogéneamente y se dividieron en vasos precipitados 250 ml en un volumen final de 150 ml de medio, se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente, se inocularon con la suspensión de estera de celulosa (aproximadamente 1%) y se incubaron a 30 °C durante 4 días en condiciones estáticas.

Concentración de inóculo

La producción de CB se evaluó con diferentes condiciones de inóculos. Se preparó el medio H-S tradicional, se mezclaron todos los componentes homogéneamente y se dividieron en vasos precipitados 250 ml en un volumen final de 150 ml de medio, se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente y se inocularon con la suspensión de estera de celulosa en concentraciones de inóculo de: 0.4%, 0.6%, 0.8% y 1% los matraces se incubaron a 30 °C durante 4 días en condiciones estáticas.

Desinfección y purificación de las membranas de celulosa bacteriana.

Una vez retiradas las membranas de celulosa de los respectivos medios, se lavaron con abundante agua destilada y luego un lavado con una solución de etanol al 70% y se dejaron reposar durante 24h; esto con el fin de eliminar impurezas y residuos provenientes del medio de cultivo (Gea et al., 2011).

Producción de celulosa.

Para establecer el peso fresco y peso seco de las membranas de BC obtenidas para los diferentes estímulos, una vez removieron las membranas del medio de fermentación se realizó el correspondiente proceso de purificación de las membranas. Seguido de eso, las membranas de CB se lavaron con agua destilada dos veces y se secó suavemente con papel absorbente para retirar el exceso de humedad antes de ser medido su peso húmedo. Posteriormente, la celulosa se secó a $60 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta que el peso alcanzara un valor constante (Moosavi-Nasab & Yousefi, 2010)

Pruebas de microfiltración y nanofiltración

Se inoculó un caldo LB con *E.coli* JC8031 a 37 °C por 18h en agitación constante, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 4500 RPM y durante 10 minutos, se pasó a realizar la prueba de filtración con cada una de las membranas obtenidas de los diferentes tratamientos, observando el cambio en la turbidez del medio, se midió la densidad óptica antes y después del filtrado y se sembró en placa con agar nutritivo para garantizar eficacia del proceso de microfiltración filtración. Para los ensayos de nanofiltración se realizará una solución de nanopartículas de hierro (Fe^+) de 5mg/l las cuales fueron donadas y caracterizadas por el laboratorio de Nanomateriales de la universidad Antonio Nariño ANEXO 1 y ANEXO 2. se hizo

pasar por el filtro ayudado de vacío y se midió el cambio en la concentración de Fe^+ luego del filtrado, mediante método colorimétrico usando el kit de prueba para hierro HI3834 de la marca Hanna, curva de calibración ANEXO 3.

2. Determinación de parámetros físico-mecánicos de las membranas ultrafiltración derivadas de celulosa bacteriana obtenidas.

Determinación de la compresibilidad de la película de celulosa.

Para la determinación de la compresibilidad se utilizó el método de Budhiono, que consta de la aplicación de un peso de 2000 g sobre las películas recientemente lavadas y secadas durante un espacio de 30 segundos, posteriormente se calcula su compresión con la siguiente ecuación:

$$v = 1 \left[- \frac{PD}{PA} \right] * 100 \quad [1]$$

Determinación la capacidad de hinchamiento.

Se tomaron membranas de celulosa secas y se procedió a cortarlas en fragmentos de 1 cm^2 , se midieron sus respectivos pesos y luego fueron sumergidas en agua destilada a 30° C durante 24 horas. Posterior a ello se secaron con papel absorbente y se tomó su masa nuevamente. El grado de hinchamiento Q, se calculó como:

$$Q = \frac{W_s}{W_d} * 100 \quad [2]$$

SEM.

La morfología de la celulosa bacteriana se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La preparación de las muestras consiste en dejar secar las membranas en una superficie de vidrio de 1 cm^2 , las cuales debían estar completamente secas. Se recubrieron capas delgadas de muestras de BC con oro usando un recubierto de pulverización iónica, se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) de la marca Teascan modelo Lyra 3 con un espectrómetro de energía dispersa (EDS) con energías de excitación desde 0,1 kV hasta 30 kV que produce imágenes de gran aumento con alta resolución (de hasta 3 nm).

Eficiencia de retención.

La eficiencia de retención se calcula comparando la cantidad de partículas retenidas en el proceso de filtración con la cantidad inicial de partículas en la corriente de alimentación. Empleando la siguiente ecuación.

$$ER\% = \frac{[I]-[F]}{[I]} * 100 \quad [3]$$

Consumo de sustrato

Para evaluar el consumo del sustrato, se realizó de manera indirecta utilizando DQO, desde el día 1 hasta el día 5 de incubación de las dos membranas seleccionadas, cada día se tomó una alícuota del medio, se pasó por un filtro de perinola de 0.47 μm para retirar la carga bacteriana de la muestra y luego fue nuevamente filtrada mediante un filtro de 0.2 μm para intentar remover las fibras de celulosa que aún se encuentran inmersas en el medio, para la medición del DQO se utilizó el Kit de Hanna 93754A-25 y se calculó la relación con el consumo aproximado de la fuente de carbono a partir del DQO.

3. Implementar las membranas obtenidas para el aislamiento de nanopartículas de un medio que simula la matriz de obtención de partículas de origen bacteriano.

Preparación del medio de simulación para nanopartículas provenientes de origen bacteriano.

Para realización de la matriz de simulación, Se inoculó un caldo LB con *E.coli* JC8031 a 37 °C por 18h en agitación constante, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 4500 RPM y durante 10 minutos, se agregó una suspensión de nanopartículas de Fe⁺ 5 mg/L las cuales son biocompatibles y no presentan características anti-microbianas.

Pretratamiento

Para el pretratamiento para el aislamiento de nanopartículas del medio simulado requiere eliminar efectivamente la carga bacteriana como proceso inicial, con el fin de hacer el sistema más rentable, se utilizó un cono de cerámica microporoso soportado sobre un recipiente para la recuperación de muestra. El cono cerámico microporoso es un dispositivo de riego automático

para plantas comercial y fácil acceso económico y reutilizable ANEXO 4. El cual es esterilizado antes de cada pretratamiento en autoclave a 121 °C durante 30 min y aislado en un recipiente hermético para garantizar la esterilidad del procedimiento. En este cono se vierte el medio simulado, y se deja filtrar por gravedad, para verificar que la eliminación de la carga bacteriana se realizó de manera correcta, se midió la densidad óptica antes y después de cultivo y se hizo un sembrado en placa en agar nutritivo.

Aplicación de membranas de ultrafiltración obtenidas en el aislamiento de nanopartículas implementando filtración al vacío.

Una vez realizado el pretratamiento se pasa al aislamiento de las nanopartículas, esto se realizó mediante la filtración al vacío. Se colocaron las membranas obtenidas a la placa interior de un embudo Büchner previamente esterilizado, como filtro, el cual se encontraba unido a un matraz Kitasato a través de un cono de goma. El tubo lateral del matraz Kitasato se conectó a una bomba de vacío. Con el fin de evaluar la capacidad de aislamiento y retención de las nanopartículas en la película de ultrafiltración obtenidas, se realizó un lavado de la membrana con agua destilada, se centrifugó 30 minutos a 4500 rpm, eliminado el sobrenadante y diluyendo las partículas en 10 ml de agua para evaluar la concentración de las Nanopartículas recogidas.

RESULTADOS Y ANALISIS

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de membranas ultrafiltración.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de una membrana de nanofiltración derivadas de BC capaces de aislar distintos tipos de nanopartículas, en especial las de origen bacteriano, se tomaron en cuenta las condiciones que principalmente modifican la estructura de BC y definen el grosor y el tamaño de poro como es el tiempo de cultivo, la fuente de carbono y la concentración de inóculo (Gullo et al., 2018).

La evaluación de las membranas obtenidas se llevó a cabo mediante un enfoque escalonado. En primera instancia, se realizaron pruebas de microfiltración como un parámetro inicial de evaluación. Las membranas que demostraron la capacidad de retener eficazmente la carga bacteriana en estas pruebas se seleccionaron para la siguiente etapa. En la etapa siguiente, se llevaron a cabo pruebas de nanofiltración utilizando una solución de nanopartículas de hierro. Este paso se realizó para evaluar la capacidad de las membranas seleccionadas para retener partículas a una escala nanométrica de manera eficiente.

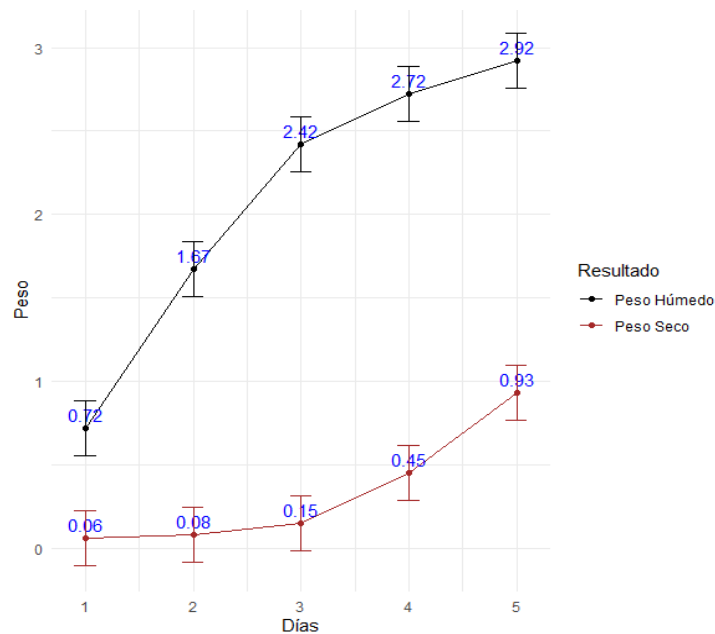


Figura 2. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes tiempos de incubación.

La formación de la BC está altamente influenciada por el período de incubación del cultivo. En el día 0 ocurre la fase de adaptación, en esta fase las bacterias se adaptan al medio de cultivo e inician su multiplicación, por lo que la producción de celulosa es mínima y no se observa formación membrana (Nugroho et al., 2022). Del día 1 al día 3 ocurre la fase de logaritmo exponencial en donde las bacterias entran en su fase de crecimiento exponencial, lo que implica una rápida multiplicación, durante esta etapa, la producción de celulosa aumenta de manera significativa como se muestra en la figura 1, a partir del día 3 ya se obtienen membranas lo suficientemente consistentes para ser manipuladas (Singh et al., 2022). Posteriormente, una vez alcanzado el máximo nivel de producción de celulosa, el crecimiento bacteriano se desacelera, y las bacterias ingresan en la fase estacionaria, esta fase se da desde el día 4 hasta el día 7; en esta fase, la producción de celulosa continúa, aunque a un ritmo más pausado (Yanti et al., 2018). Si el cultivo se prolonga durante más de 7 días, se da la fase de declinación, durante esta etapa, la producción de celulosa disminuye aún más, y las bacterias entran en una fase de declinación que se asocia con el agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos de desecho (Yassine et al., 2016).

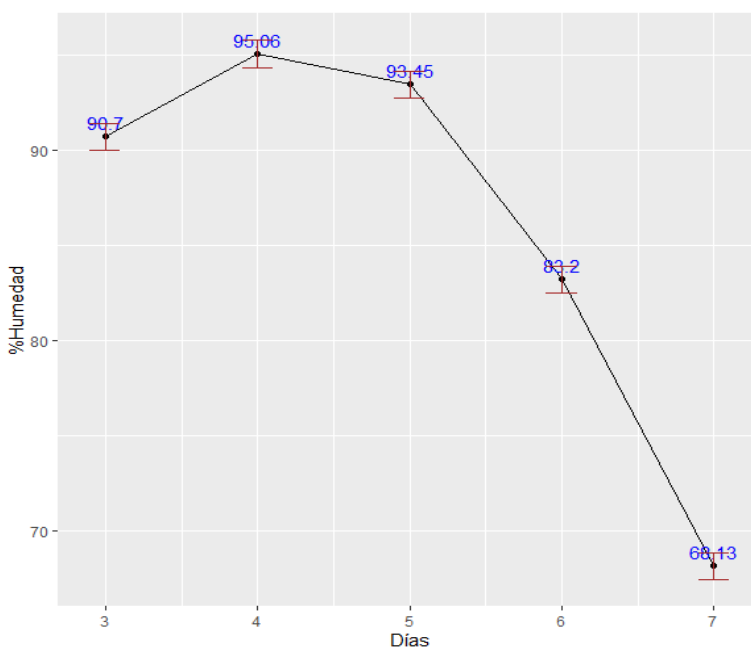


Figura 3. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes tiempos de incubación.

El porcentaje de humedad en la celulosa bacteriana varía en función del tiempo de incubación, en las fases iniciales del cultivo, la humedad es relativamente alta, como se observa en la figura 3,

ya que las membranas tienen densidades y tamaños de poro altos lo que le permite retener mayor cantidad de agua, aumentando el porcentaje de humedad (Pynirtzi et al., 2023). A medida que el cultivo avanza hacia las fases estacionarias y de declinación, la celulosa pierde humedad, como se muestra en la figura 3, lo que da como resultado una disminución del porcentaje de humedad.

Tabla 1. Pruebas de microfiltrado días de incubación

Días	D.O (I)	D.O (F)
3	0,806	0,0313 ± 0,003
4	1,032	0,0186 ± 0,0025
5	1,225	0,0133 ± 0,003

A partir del tercer día, al llevar a cabo las pruebas de filtrado, se puede observar una notable reducción en la presencia de bacterias en el medio, como se ilustra en la Figura 4A. Esto se correlaciona con una disminución de la densidad óptica, mostrada en la Tabla 1. Sin embargo, al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano, lo que sugiere que el período de tiempo transcurrido hasta el tercer día no es suficiente. A partir del cuarto día, las membranas ya han adquirido la capacidad necesaria para la remoción efectiva de la carga bacteriana, como se demuestra en las Figuras 4B y 4C.

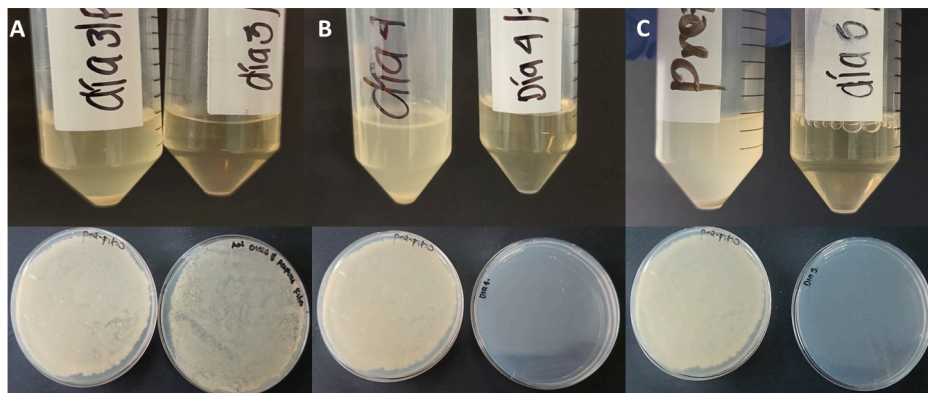


Figura 4. Pruebas de microfiltración. A. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 3; B. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 4; C. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado día 5.

Tabla 2. Pruebas de nanofiltración tiempo incubación.

Día	[Fe]i mg/L	[Fe]f mg/L
4	25	0,73 ± 0,19
5		0,24 ± 0,038

A partir del cuarto día de incubación, las membranas obtenidas mostraron su capacidad para el aislamiento de nanopartículas, como se evidenció en las pruebas de nanofiltración. Esta capacidad quedó confirmada a través de una importante disminución de la concentración de hierro en las muestras después de su paso a través de las membranas de BC, como se muestra en la tabla 2. Este resultado muestra la capacidad de las membranas en la retención y filtración de nanopartículas a partir del cuarto día de incubación. De acuerdo con los resultados obtenidos, se establece que el tiempo de incubación para la obtención de membranas BC para nanofiltración es de 4 días.

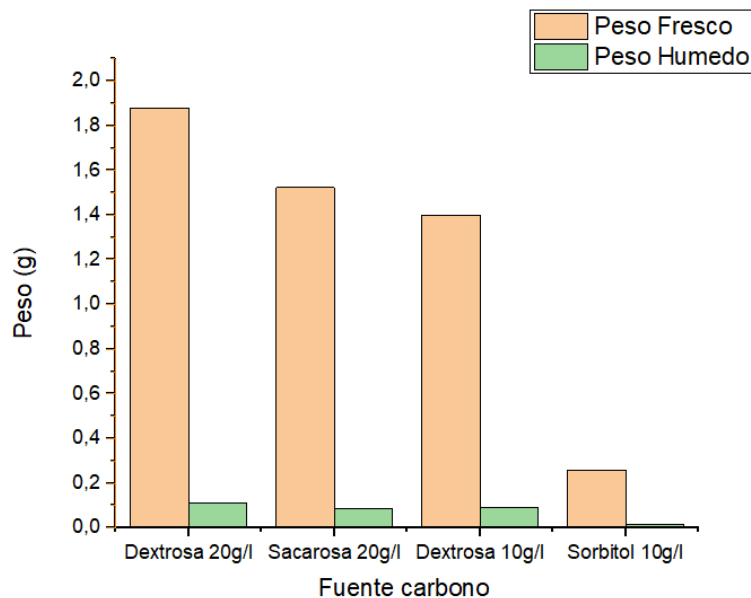


Figura 5. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes fuentes de carbono

La capacidad de filtración de las membranas de BC dependen del tamaño, distribución, densidad y conectividad de los poros, estas características se afectan directamente por la fuente de carbono que se utilice (Garcia et al., 2018). Los cambios en la concentración en las fuentes de carbono también pueden variar estos parámetros, ya que a medida que aumenta la concentración de carbono aumenta la densidad y conectividad de los poros, lo que dificultando el flujo a través de la membrana, como se muestra en la figura 7A y 7C.

La utilización de sacarosa como fuente de carbono, dio como resultado una disminución en la producción de celulosa, como se ve en la figura 6, con respecto al control con dextrosa 20 g/L, esto puede ser debido a que la sacarosa es un disacárido compuesto por dos azúcares simples, glucosa y fructosa, unidos por una unión o-glucosídica, las bacterias deben separar esta unión y descomponer la sacarosa en dextrosa y fructosa, lo que requiere gasto energético adicional (K. Zhang et al., 2022). Por otra parte, la eficiencia del sorbitol en la producción de BC se vio disminuida en el caso de *G. xylinum*, esta disminución de eficiencia podría estar relacionada con el hecho de que el sorbitol, siendo un poliol o alcohol de azúcar, podría influir negativamente en las tasas de crecimiento bacteriano, lo que resulta en un proceso más lento. Esto, a su vez, llevó a que, al final del período de incubación elegido, se formara una película de celulosa extremadamente delgada y frágil que no fue posible manipular para llevar a cabo las pruebas de microfiltrado.

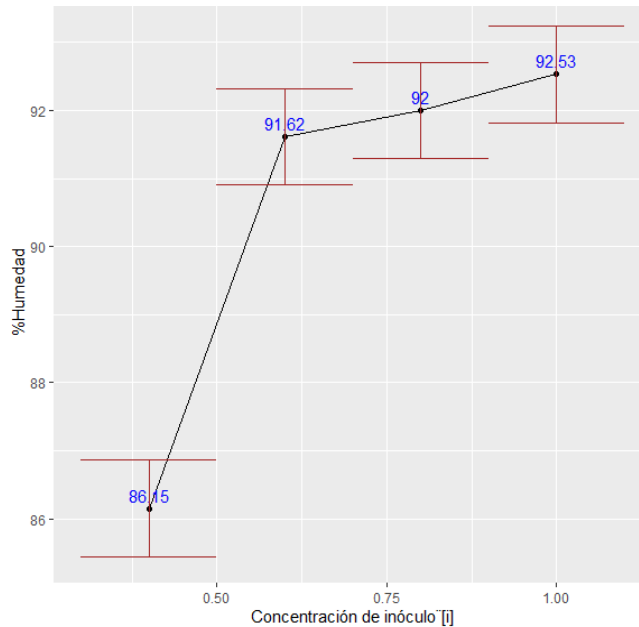


Figura 6. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes fuentes de carbono.

El porcentaje de humedad en la BC puede variar según la fuente de carbono, como se muestra en la figura 6, la sacarosa se caracteriza por presentar una distribución menos uniforme, con mayor tamaño, menor densidad y conectividad de los poros, lo que le permite retener más agua y tener un porcentaje de humedad mayor con respecto a la dextrosa, quien tiende a formar poros más pequeños y un entrelazado más uniforme que reduce su capacidad de retención de agua por lo que tiene un porcentaje de humedad menor.

Tabla 3. Pruebas de microfiltrado fuentes de carbono.

FC	D.O (I)	D.O (f)
Dextrosa 20g/l	1,062	0,0163 ± 0,0015
Sacarosa 20g/l	0,932	0,0343± 0,0071
Dextrosa 10g/l	1,252	0,0256± 0,00007
Sorbitol 20g/l

Todas las fuentes de carbono evaluadas mostraron una notable reducción en la presencia de bacterias en el medio, como se ilustra en la Figura 7. Esto se correlaciona con una disminución

de la densidad óptica, como se muestra en la Tabla 3. Sin embargo, al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano en sacarosa al 20g/L y en dextrosa 10g/L, lo que sugiere que para la aplicación de nanofiltración con el menor tiempo de incubación se obtendrá mejores resultados implementando el medio H-S tradicional como se muestra en la figura 7A.

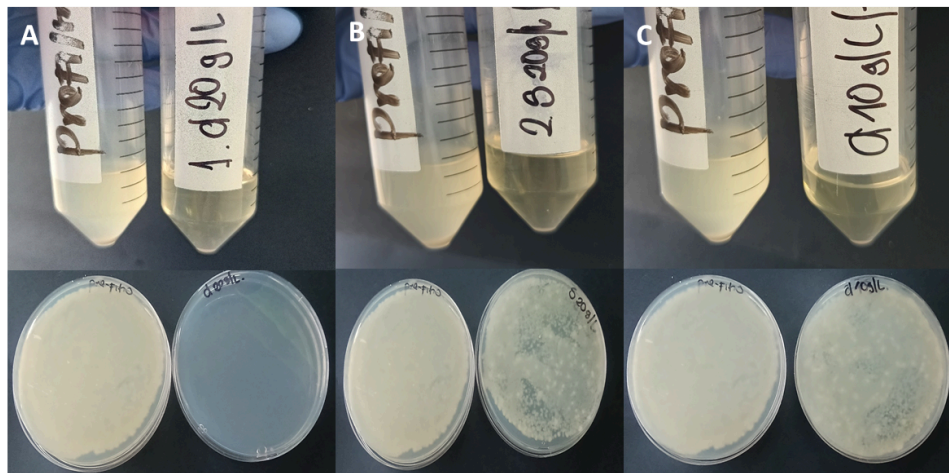


Figura 7. Pruebas de microfiltración. A. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado dextrosa 20 g/L; B. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado Sacarosa 10 g/L; C. diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado.

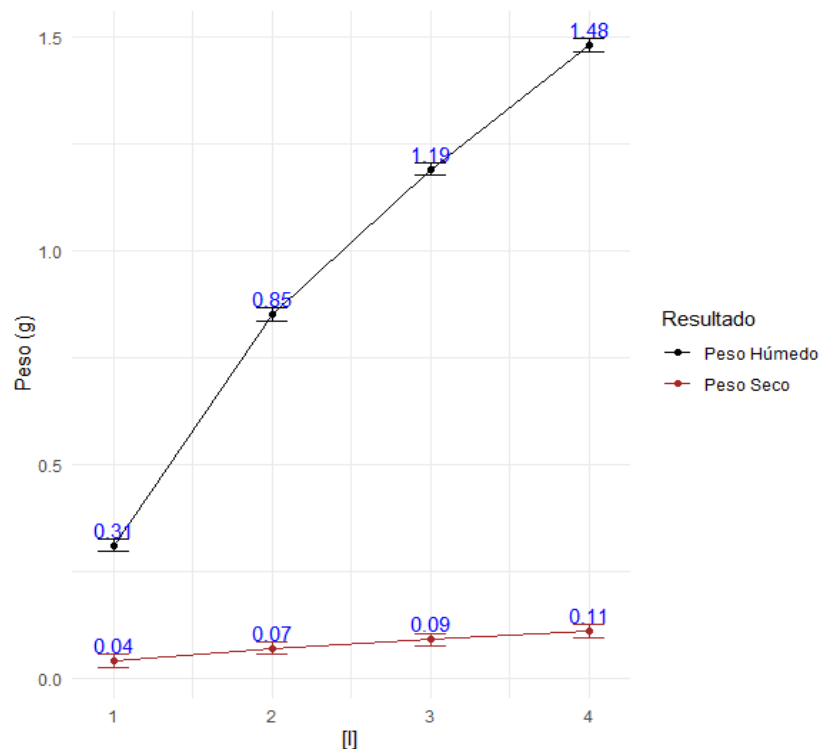


Figura 8. Producción de celulosa Húmeda (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes concentraciones de inculo.

Como se sabe, la concentración de inculó afecta directamente las propiedades de porosidad y producción de BC. Un inculo más concentrado da lugar a una mayor producción y disminuyendo la densidad de los poros de BC como se muestra en la figura 8, modificando la permeabilidad y en la capacidad de filtración de BC. Además, la concentración de inculó también puede afectar el tamaño y la distribución de los poros en la membrana. Un inculo más concentrado tiende a producir poros más pequeños y uniformemente distribuidos en la membrana, dando como resultado una estructura de poros más homogénea y una mayor uniformidad de las membranas.

Figura 9. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes concentraciones de inculo

Tabla 4. Pruebas de microfiltrado concentraciones de inóculo

[I]	D.O (I)	D.O (f)
0,40%	0,806	0,058 ± 0,009
0,60%	1,032	0,018 ± 0,003
0,80%	1,225	0,0126 ± 0,002
1%	0,956	0,013 ± 0,0007

Al llevar a cabo las pruebas de filtrado, se puede observar que en todas las concentraciones de inóculo se presenta una reducción notable de bacterias presentes en el medio, como se ilustra en la Figura 10. Esto se correlaciona con una disminución de la densidad óptica, mostrada en la Tabla 4. Al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano únicamente en la concentración 0,40% como se muestra en la figura 10A, el resto de las membranas obtenidas fueron efectivas para la remoción de bacterias.

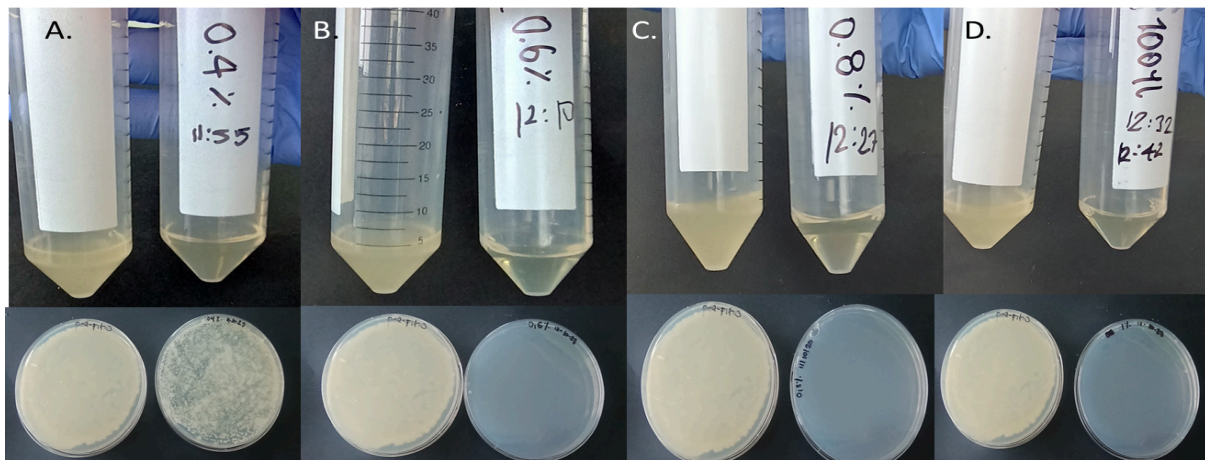


Figura 10. Pruebas de microfiltración. **A.** diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,4%; **B.** diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,6%; **C.** diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado [i] 0,8%; **D.** diferencia en la turbidez y siembra en placa del filtrado.

Tabla 5. Pruebas de nanofiltración concentración inóculo.

[I]	[Fe+]i mg/L	[Fe+]f mg/L
-----	-------------	-------------

0,60%	25	1,523 ± 0,498
1%		0,603 ± 0,603

Como se puede observar en la Tabla 3, no se aprecian diferencias importantes en los resultados de los ensayos de microfiltración entre las concentraciones del 0,8% y el 1%. A partir de una concentración del 0,6% se evidencia la retención de nanopartículas Tabla 5. Por esta razón, se procedió a evaluar las características físico- mecánicas de membranas de BC obtenidas en un medio H-S tradicional, con un tiempo de incubación de 4 días, empleando concentraciones del inoculo del 0,6% y el 1%.

2. Determinación de parámetros físico-mecánicos de las membranas ultrafiltración derivadas de BC obtenidas.

Determinación de la comprensibilidad e hinchamiento de la película de celulosa

Los porcentajes de hinchamiento y comprensibilidad son parámetros importantes que proporciona información sobre el comportamiento y la eficacia de la membrana de BC para filtración y separación; la capacidad de hinchamiento de CB, está directamente relacionada con la densidad y tamaño de los poros de la membrana, esto significa que entre mayor sea la porosidad y el tamaño de los espacios existentes, aumenta el porcentaje de hinchamiento (J. Zhang et al., 2022). Debido a que la BC es un material altamente poroso y que suele retener bastante humedad, genera porcentajes de hinchamiento mayor a 100% como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Comprensibilidad e hinchamiento membranas BC.

MEMBRANA	% DE COMPRESIBILIDAD	% DE HINCHAMIENTO
0,60%	38,44 ± 1,987	150,85 ± 2,207
1%	31,28 ± 0,724	131,63 ± 5,737

La aplicación de las membranas de BC nanofiltración implica que la membrana sea capaz de mantener su integridad y rendimiento bajo las condiciones de operación de altas presión y/o

condiciones de vacío necesarias. Los porcentajes de compresibilidad se encuentran por debajo del 50%, lo que indica que la membrana es resistente a la deformación bajo presión y/o vacío, como se muestra en la tabla 6, asegurando el mantenimiento de la red estructural de la membrana. Además, la baja compresibilidad contribuye a una vida útil más prolongada de la membrana, una mayor resistencia a la presión y una mayor eficiencia de separación, lo que podría permitir la reutilización de las membranas.

SEM

La morfología de la membrana de celulosa se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con esto se observó la distribución de los poros de las capas más superficiales y tamaño aproximado de las membranas obtenidas. Las membranas de CB en forma tridimensional en la Figura 11A y 12A se pudo observar la que las membranas obtenidas en la concentración de inoculo al 0,6% tienen una mayor densidad de poros en la membrana con respecto a la concentración del 1%.

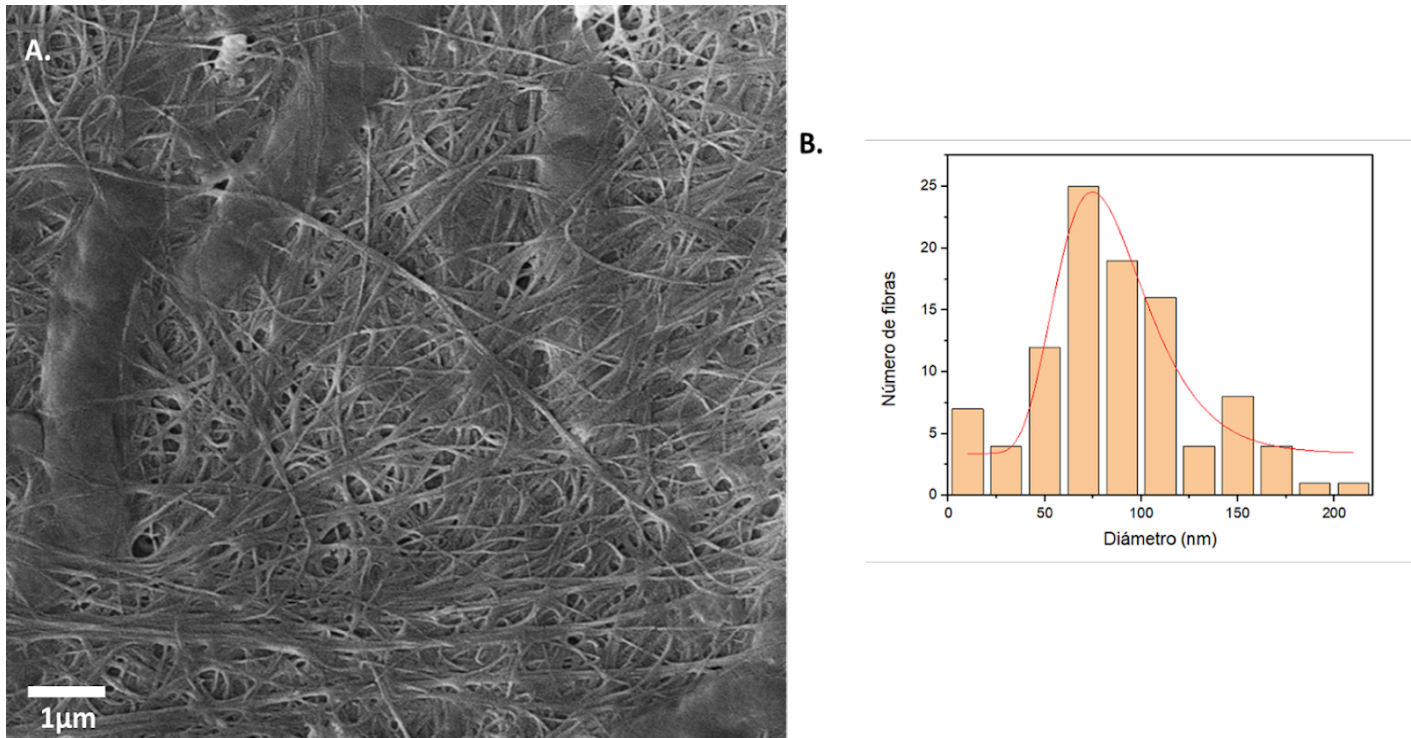


Figura 11. SEM. A. SEM 0,6%; B. Distribución de tamaños de fibra 0,6%.

El tamaño aproximado de las fibras de celulosa que se encuentran generadas es de 81,965 nm con una desviación 27,643 nm para el 0,6% como se muestra en la Figura 11B y de 89.645 nm con una desviación 26,723 nm como se muestra en la Figura 12B. Además de mostrar que la composición atómica de estas membranas en su mayoría es carbono, según lo mostrado en el EDX, lo que confirma la pureza de dichas membranas. ANEXO 5.

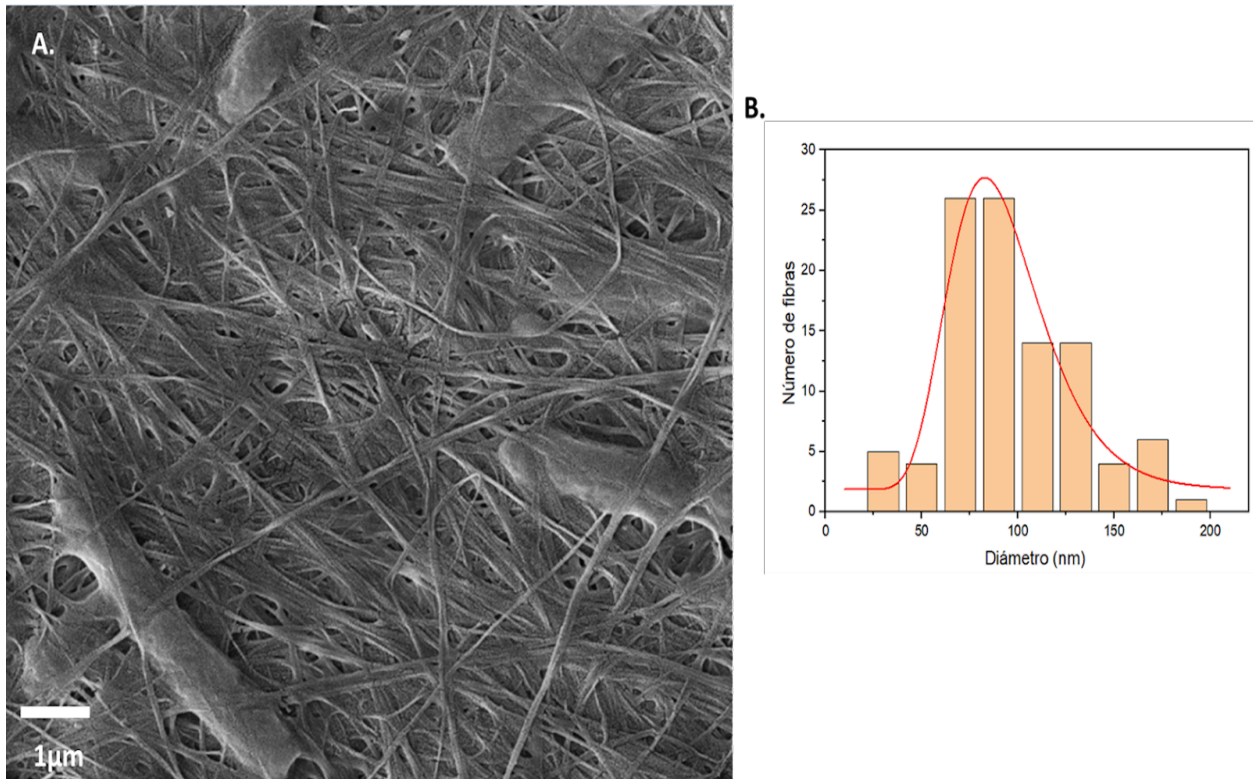


Figura 12. SEM. A. SEM 1%; B. Distribución de tamaños de fibra 1%.

Capacidad de filtración

La eficiencia de las membranas en cuanto a la retención de nanopartículas es alta, con un porcentaje de un 99,964 % y el 99,981 % respectivamente como se muestra en la tabla 7, el porcentaje de retención es un indicador de la eficiencia de un proceso de filtración o separación, un porcentaje alto refleja la capacidad del sistema de filtración para el aislamiento de nanopartículas lo que permitirá su implementación en el aislamiento de biomoléculas de origen biológico.

Tabla 7. Porcentaje de retención.

Membrana	Velocidad (mL/min*cm²)	[Fe+]i (mg/L)	[Fe+]f (mg/L)	% Retención
0,60%	0,059 ± 0,0034	50000	0,655± 0,0768	99,964 ± 0,00427
1%	0,040 ± 0,0040		1,777± 0,2137	99,987± 0,0405

Consumo de sustrato

El consumo de sustrato se midió de forma indirecta utilizando la Demanda Química de Oxígeno (DQO). La DQO tiene una relación empírica con la cantidad de gramos de glucosa y se basa en la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica presente en la muestra. La relación típica entre la DQO y los gramos de glucosa es de aproximadamente 2.67 g de glucosa por unidad de DQO. En la Gráfica 12, se representa el consumo de la dextrosa a medida que avanza el cultivo. Para llevar a cabo este análisis se garantiza de que el valor de DQO obtenido fuera lo más representativo posible de la dextrosa que se encontraba en el medio. Por esta razón, se realizaron dos filtraciones, con el propósito de eliminar la carga bacteriana y algunas fibras de celulosa que aún no se unen a la membrana y están inmersas en el medio, los cuales también son materia orgánica y podrían afectar el resultado obtenido.

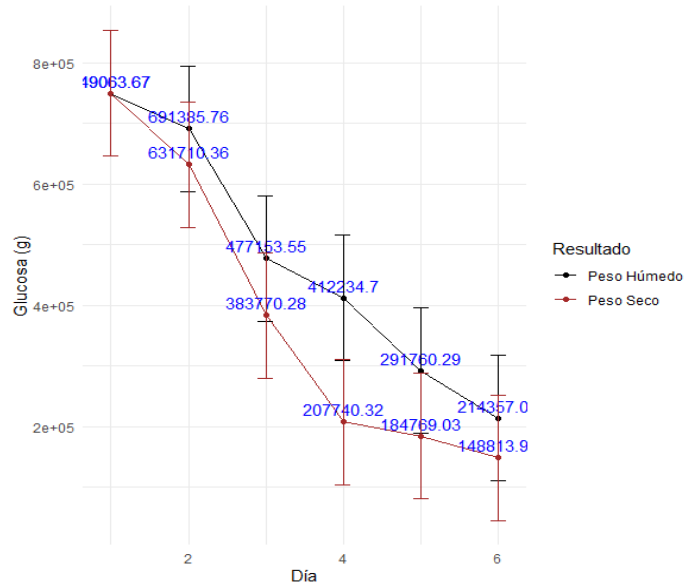


Figura 13. Consumo de sustrato. Cuantificación del sustrato por día de incubación de la membrana.

Implementar las membranas obtenidas para el aislamiento de nanopartículas medio de un medio que simula la matriz de obtención de partículas de origen bacteriano.

El procesamiento del medio que simula las condiciones presentes en un cultivo del cual se pueden obtener estructuras y partículas generadas por bacterias de interés biotecnológico con el fin de obtenerlas y aislarlas, requiere de tres etapas fundamentales, pretratamiento, aislamiento y recuperación, en la primera etapa se debe realizar un pretratamiento en el cual se debe asegurar la eliminación total de la carga microbiana. Para lograr esto, se implementó un sistema de filtración por gravedad, usando conos de cerámica, los cuales son de fácil acceso, reutilizables, autoclavables y de bajo costo utilizando el sistema que se muestra en el ANEXO 7. Este pretratamiento demostró ser altamente prometedor en términos de eliminar la carga bacteriana, como se ilustra en la Tabla 8. En esta tabla, se puede observar una notable reducción en la densidad óptica luego de aplicado el pretratamiento. Además, al llevar a cabo pruebas de siembra en placas, no se ha evidenciado crecimiento bacteriano mostrado en el ANEXO 8.

Tabla 8. Pretratamiento.

D.Oi	D.O f
------	-------

0,731± 0,152	0,018 ± 0,0061
--------------	----------------

Una vez se asegura la eliminación de la carga bacteriana, se procede al aislamiento. Este proceso se inicia con una concentración inicial de 5 mg/L de nanopartículas de Fe⁺. Para facilitar la etapa de filtrado, se emplea un sistema de vacío, lo que permite facilitar el paso de medio a través de la membrana debido a la compleja estructura tridimensional con la que cuenta. Esto, a su vez, conduce a una notable reducción en el tiempo requerido para el proceso de filtrado, al tiempo que se mantiene la esterilidad del sistema en todo momento, como se ilustra en el ANEXO 8. La Tabla 9 confirma muestra que el aislamiento de las nanopartículas de Fe⁺ del medio fue bastante bueno.

Tabla 9. Aislamiento de nanopartículas.

Membranas	[Fe ⁺] _i (mg/L)	[Fe ⁺] _f (mg/L)
0,60%	5	0,78± 0,13
1%		0,35±0,12

En el contexto de los procesos de filtración, la etapa de recuperación se convierte en un punto crítico para la obtención eficaz de los componentes deseables previamente retenidos en las membranas, lo que, a su vez, facilita su posterior aprovechamiento o procesamiento. Este aspecto cobra una importancia en aplicaciones de biotecnología, donde la eficiencia del proceso de recuperación es un importante. En esta área, la recuperación debe garantizar la obtención de los productos con un alto grado de pureza y rendimiento.

Tabla 10. Recuperación de nanopartículas.

Membranas	[Fe ⁺] mg/L recuperado
0,60%	9,344 ± 0,98

1%	11,17 ± 1,10
----	--------------

Mediante la combinación de técnicas que incluyen el lavado de las membranas, la centrifugación y la reconcentración, se ha logrado una mejora sustancial en la recuperación de partículas que retenidas en las membranas. Como se observa en la tabla 10 se logró una mejor recuperación en la membrana del 1%, en comparación con la del 0,06%. Estos resultados sugieren que la metodología utilizada tiene un potencial prometedor para su aplicación en matrices reales, lo que a su vez podría conllevar una reducción sustancial de los costos en la producción y su modificación de acuerdo a las moléculas objetivos.

CONCLUSIONES

- La facilidad para modificar el tamaño y densidad de poro con la modificación de las condiciones de cultivo hace que se pueda pensar en su utilización para sistema de filtrados de moléculas específicas, ya sean de distintos tamaños y/o especies químicas.
- Las características físico-químicas óptimas que presentan las membranas obtenidas, le permiten soportar grandes presiones sobre ellas sin variar mucho su masa, muestran que pueden ser utilizadas varias veces antes de perder sus propiedades de retención, además son resistentes deformación y daño por rupturas.
- El tratamiento de las membranas mediante lavados con agua destilada y la utilización de etanol al 70% se demostró altamente efectivo para eliminar los residuos bacterianos que se acumulan durante la síntesis bacteriana de la celulosa. Este enfoque no solo resulta en una reducción de los costos de producción, sino que también es amigable con el medio ambiente al eliminar la necesidad de utilizar hidróxido de sodio y especies de cloro en el proceso.
- El proceso de aislamiento y recuperación de nanopartículas a través de membranas de BC ha demostrado ser altamente efectivo, con una eficiencia de retención superior al 99%.

Este enfoque ofrece un gran potencial para su aplicación en campos tan diversos como la biotecnología y la farmacología.

- El sistema de pretratamiento utilizado es una excelente alternativa para hacer más económico y óptimo el aislamiento y purificación de las partículas de interés, debido a que es comercial, de fácil acceso, reutilizable y de fácil esterilización.
- La estandarización del sistema, que abarca el pretratamiento, aislamiento y recuperación para la purificación y obtención de estructuras, moléculas o partículas de origen bacteriano de relevancia en el ámbito biotecnológico y farmacéutico, podría permitir una reducción sustancial de los costos energéticos y de producción que actualmente caracterizan la obtención comercial de estos elementos.

RECOMENDACIONES

- Implementar el sistema de aislamiento en matriz real para la obtención de estructuras derivadas de bacterias.
- Estandarizar cada paso del aislamiento de las estructuras y evaluar su rendimiento mediante los protocolos tradicionales usados para la obtención de estas estructuras.
- Evaluar estadísticamente cuál de las dos membranas encontradas podría tener resultados significativos, en cuanto a velocidad de filtrado y recuperación de membranas.
- Evaluar la producción de estas membranas con fuentes de carbono complejas como melaza o desechos orgánicos complejos que permitan disminuir los costos de producción.

REFERENCIAS

- Ahmad, M., Ahmed, S., Swami, B. L., & Ikram, S. (2015). Adsorption of heavy metal ions: Role of chitosan and cellulose for water treatment. *Langmuir*, *79*, 109-155.
- Ahmad, Z. S., & Munaim, M. S. A. (2018). Effect of time, moisture content, and substrate amount on sorbitol production using entrapment of *Lactobacillus plantarum* (BAA-793) in sodium alginate beads. *Food Bioscience*, *21*, 27-33.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.002>
- Barraque, C., Bebin, J., Bernard, J., & Marmagne, J. (1979). Manual técnico del agua. *Capítulo 9: Filtración*.
- Betlej, I., Salerno-Kochan, R., Krajewski, K. J., Zawadzki, J., & Boruszewski, P. (2020). The influence of culture medium components on the physical and mechanical properties of cellulose synthesized by kombucha microorganisms. *BioResources*, *15*(2), 3125-3135.
<https://doi.org/10.15376/biores.15.2.3125-3135>
- Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C.-C., Verma, V., Wang, H.-T., Ismadji, S., & Cheng, K.-C. (2020). Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, *40*(3), 397-414.

<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>

- Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review. *Cellulose*, 23(1), 57-91. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>
- Campbell, M. K., Farrell, S. O., Reyes, A. C., Gasco, J. H. C., Talavera, J. B., Bonilla, A. C., & Muñoz, G. R. (2004). *Bioquímica* (Vol. 4). Thomson.
- Carreño Pineda, L. D. (2011). *Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana*.
- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A. C. M., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: Una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307-335. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.8.16.12>
- Chao, Y. -p., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., & Shoda, M. (1997). [No title found]. *Biotechnology Techniques*, 11(11), 829-832. <https://doi.org/10.1023/A:1018433526709>
- Chávez-Pacheco, J. L., & Martínez-Yee, S. (2004). *CELULOSA BACTERIANA EN GLUCONACETOBACTER XYLINUM: BIOSÍNTESIS Y APLICACIONES*. 7(1), 9.
- Ciardelli, G., Corsi, L., & Marcucci, M. (2001). Membrane separation for wastewater reuse in the textile industry. *Resources, Conservation and Recycling*, 31(2), 189-197. [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(00\)00079-3](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(00)00079-3)
- Clasen, C., Sultanova, B., Wilhelms, T., Heisig, P., & Kulicke, W. (2006). *Effects of different drying processes on the material properties of bacterial cellulose membranes*. 244(1), 48-58.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown Jr, R. M. (2006). Microbial cellulose—The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145-151.
- Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R. malcolm. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3/4), 403-411. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>
- dos Reis Coimbra, J. S., & Teixeira, J. A. (2016). *Engineering aspects of milk and dairy*

products. CRC Press.

- Dubey, V., Saxena, C., Singh, L., Ramana, K. V., & Chauhan, R. S. (2002). Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 27(2), 163-171. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(01\)00210-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(01)00210-6)
- Embuscado, M. E., Marks, J. S., & BeMiller, J. N. (1994). Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocolloids*, 8(5), 407-418. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80084-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2)
- Garcia, N. L., Ribba, L., Cimadoro, J. D., & Goyanes, S. (2018). Electrospun mat swelling: An ally to improve membrane rejection ratio. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 09. <https://doi.org/10.4172/2157-7048-C1-012>
- Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., & Peijs, T. (2011). Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technology*, 102(19), 9105-9110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.077>
- George, J., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N., Jagannath, J. H., & Bawa, A. S. (2005). Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International journal of biological macromolecules*, 37(4), 189-194.
- Gullo, M., La China, S., Falcone, P. M., & Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6885-6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>
- Gutiérrez, I., Zuluaga, R., Cruz, J., & Gañán, P. (2005). Influence of steam treatment on the structure and physical-mechanical behavior of plantain fibers. *Información Tecnológica*, 16(2), 15.
- Ha, J. H., & Park, J. K. (2012). Improvement of bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum* using byproduct produced by *Gluconacetobacter hansenii*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29, 563-566.
- Han, N. S., & Robyt, J. F. (1998). The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose

- biosynthesis: Direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. *Carbohydrate Research*, 313(2), 125-133.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00253-5)
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345.
- Hu, Y., Catchmark, J. M., & Vogler, E. A. (2013). Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and Their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth. *Biomacromolecules*, 14(10), 3444-3452.
<https://doi.org/10.1021/bm400744a>
- Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., & Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21(1), 1-30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: A review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911.
<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 183-188.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80199-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80199-6)
- Ibáñez Lorente, R. (2007). *Estudio de la ultrafiltración de proteínas modelo con membranas cerámica*.
- Jung, H.-I., Jeong, J.-H., Lee, O.-M., Park, G.-T., Kim, K.-K., Park, H.-C., Lee, S.-M., Kim, Y.-G., & Son, H.-J. (2010). Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresource technology*, 101(10), 3602-3608.
- Jung, J. Y., Park, J. K., & Chang, H. N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 347-354.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.019>

- Keshk, S. (2006). Physical properties of bacterial cellulose sheets produced in presence of lignosulfonate. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 9-12.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.038>
- Khan, A. W., & Colvin, J. R. (1961). Isolation of the precursor of bacterial cellulose. *Journal of Polymer Science*, 51(155), 1-9. <https://doi.org/10.1002/pol.1961.1205115501>
- Khattak, W. A., Khan, T., Ul-Islam, M., Wahid, F., & Park, J. K. (2015). Production, Characterization and Physico-mechanical Properties of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(1), 45-53.
<https://doi.org/10.1007/s10924-014-0663-x>
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 318-321. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)85682-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)85682-6)
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kaminoyama, M., & Kamiwano, M. (1996). Characterization of non-newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 382-386.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89155-0](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89155-0)
- Krystynowicz, A., Bielecki, S., Czaja, W., & Rzyńska, M. (2000). Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. En *Progress in Biotechnology* (Vol. 17, pp. 323-327). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(00\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(00)80088-X)
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezińska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189-195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Abdul Kari, Z., Mohd Noor, N. H., & Ray, R. R. (2021). Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12984. <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>

- Le-Clech, P., Chen, V., & Fane, T. A. G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), 17-53.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.08.019>
- Lee, J. H., Brown, R. M., Kuga, S., Shoda, S., & Kobayashi, S. (1994). Assembly of synthetic cellulose I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7425-7429.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7425>
- Lehtonen, J., Chen, X., Beaumont, M., Hassinen, J., Orelma, H., Dumée, L. F., Tardy, B. L., & Rojas, O. J. (2021). Impact of incubation conditions and post-treatment on the properties of bacterial cellulose membranes for pressure-driven filtration. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117073. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117073>
- Lima, L. R., Santos, D. B., Santos, M. V., Barud, H. S., Henrique, M. A., Pasquini, D., Pecoraro, E., & Ribeiro, S. J. (2015). Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. *Química Nova*, 38, 1140-1147.
- Lu, H., & Jiang, X. (2014). Structure and Properties of Bacterial Cellulose Produced Using a Trickling Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 3844-3861.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0795-4>
- Ma, C., Jiang, F., Ma, Y., Wang, J., Li, H., & Zhang, J. (2019). Isolation and Detection Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer Diagnostic. *Dose-Response*, 17(4), 155932581989100. <https://doi.org/10.1177/1559325819891004>
- Marx-Figini, M., & Pion, B. G. (1974). Kinetic investigations of biosynthesis of cellulose by *Actobacter xylinum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 338(2), 382-393. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90299-2)
- Mkumbaye, S. I., Minja, D. T. R., Jespersen, J. S., Alifrangis, M., Kavishe, R. A., Mwakalinga, S. B., Lusingu, J. P., Theander, T. G., Lavstsen, T., & Wang, C. W. (2017). Cellulose filtration of blood from malaria patients for improving ex vivo growth of *Plasmodium falciparum* parasites. *Malaria Journal*, 16(1), 69.
<https://doi.org/10.1186/s12936-017-1714-2>
- Moosavi-Nasab, M., & Yousefi, A. R. (2010). Investigation of physicochemical properties of the

- bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 44, 1258-1263.
- Mormino, R., & Bungay, H. (2003). Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6), 503-506.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1377-5>
- Nakatsubo, F., Kamitakahara, H., & Hori, M. (1996). Cationic ring-opening polymerization of 3, 6-di-O-benzyl- α -D-glucose 1, 2, 4-orthophosphate and the first chemical synthesis of cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 118(7), 1677-1681.
- Nugroho, D. A., Sutiarto, L., Rahayu, E. S., & Masithoh, R. E. (2022). Kinetics observations of bacterial cellulose thickness formation using imageprocessing approach during the fermentation process. *Food Research*, 6(1), 210-214.
[https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(1\).093](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(1).093)
- Nunes, S. P., & Peinemann, K.-V. (2001). *Membrane technology*. Wiley Online Library.
- Ortiz, M. M. M., & Hernández, J. M. (2004). Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 26-34.
- Pandey, L. K., Saxena, C., & Dubey, V. (2005). Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 42(3), 213-218.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.07.014>
- Phulara, S. C., Chaturvedi, P., Chaurasia, D., Diwan, B., & Gupta, P. (2019). Modulation of culture medium confers high-specificity production of isopentenol in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(4), 458-464.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.002>
- Pynirtzi, N., Debnath, K. B., Lantzanakis, G., Bloch, K., Scott, J., Davie, C., & Bridgens, B. (2023). Evaluating the Humidity Responsiveness of Bacterial Cellulose for Application in Responsive, Breathable Building Skins. En S. Amziane, I. Merta, & J. Page (Eds.), *Bio-Based Building Materials* (Vol. 45, pp. 640-652). Springer Nature Switzerland.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-33465-8_49
- Rani, M. U., & Appaiah, A. (2011). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose

- production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology*, 61(4), 781-787. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0196-7>
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6(1), 12-19.
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35-58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>
- Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F., & Usuda, M. (1993). Bacterial cellulose membrane as separation medium. *Journal of Applied Polymer Science*, 50(6), 965-969. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070500605>
- Singh, M. K., Singh, A., & Pandey, A. (2022). *Optimization of Bacterial Cellulose Production Using Jaggery Waste by Response Surface Method* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1780504/v1>
- Sokolnicki, A. M., Fisher, R. J., Harrah, T. P., & Kaplan, D. L. (2006). Permeability of bacterial cellulose membranes. *Journal of membrane science*, 272(1-2), 15-27.
- Soriano Bartolo, A. (2001). *Investigación sobre el empleo de membranas en tratamientos terciarios de desinfección*.
- Sperotto, G., Stasiak, L. G., Godoi, J. P. M. G., Gabiatti, N. C., & De Souza, S. S. (2021). A review of culture media for bacterial cellulose production: Complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose*, 28(5), 2649-2673. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5>
- Suárez Díez, L. (2014). *Reutilización de detergentes industriales: Aplicación de la tecnología con membranas en disoluciones modelo de detergentes*.
- Sun, B., Lin, J., Liu, M., Li, W., Yang, L., Zhang, L., Chen, C., & Sun, D. (2022). *In Situ Biosynthesis of Biodegradable Functional Bacterial Cellulose for High-Efficiency Particulate Air Filtration*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(4), 1644-1652. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c07532>
- Suryanto, H., Kurniawan, F., Syukri, D., Binoj, J. S., Hari, P. D., & Yanuhar, U. (2023).

- Properties of bacterial cellulose acetate nanocomposite with TiO₂ nanoparticle and graphene reinforcement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123705. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123705>
- Tiongson, J., Bugante, E., & Del Rosario, E. (2002). Development of ultrafiltration membranes from bacterial cellulose (nata de coco) for the separation of mango volatile organic compounds. *Philippine Agricultural Scientist*.
- Troncoso, O. P., & Torres, F. G. (2020). Bacterial Cellulose—Graphene Based Nanocomposites. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6532. <https://doi.org/10.3390/ijms21186532>
- Urbina, L., Guaresti, O., Requies, J., Gabilondo, N., Eceiza, A., Corcuera, M. A., & Retegi, A. (2018). Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters. *Carbohydrate Polymers*, 193, 362-372. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.007>
- Vandamme, E., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer degradation and stability*, 59(1-3), 93-99.
- Villalobos, A. C. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*, 243-264.
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). [No title found]. *Cellulose*, 5(3), 187-200. <https://doi.org/10.1023/A:1009272904582>
- Williams, W. S., & Cannon, R. E. (1989). Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2448-2452. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2448-2452.1989>
- Yang Hu & Jeffrey M Catchmark. (2010). Studies on Sphere-like Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* under Agitated Culture. *2010 Pittsburgh, Pennsylvania, June 20*

- June 23, 2010. 2010 Pittsburgh, Pennsylvania, June 20 - June 23, 2010.
<https://doi.org/10.13031/2013.29706>

Yanti, N. A., Ahmad, S. W., & Muhiddin, N. H. (2018). Evaluation of inoculum size and fermentation period for bacterial cellulose production from sago liquid waste. *Journal of Physics: Conference Series*, 1116, 052076.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1116/5/052076>

Yassine, F., Bassil, N., Chokr, A., El Samrani, A., Serghei, A., Boiteux, G., & El Tahchi, M. (2016). Two-step formation mechanism of *Acetobacter* cellulosic biofilm: Synthesis of sparse and compact cellulose. *Cellulose*, 23(2), 1087-1100.
<https://doi.org/10.1007/s10570-016-0884-3>

Zakaria, J., & Nazeri, M. (2012). *Optimization of bacterial cellulose production from pineapple waste: Effect of temperature, pH and concentration*. 5th engineering conference, "engineering towards change-empowering green solutions.

Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506-513.

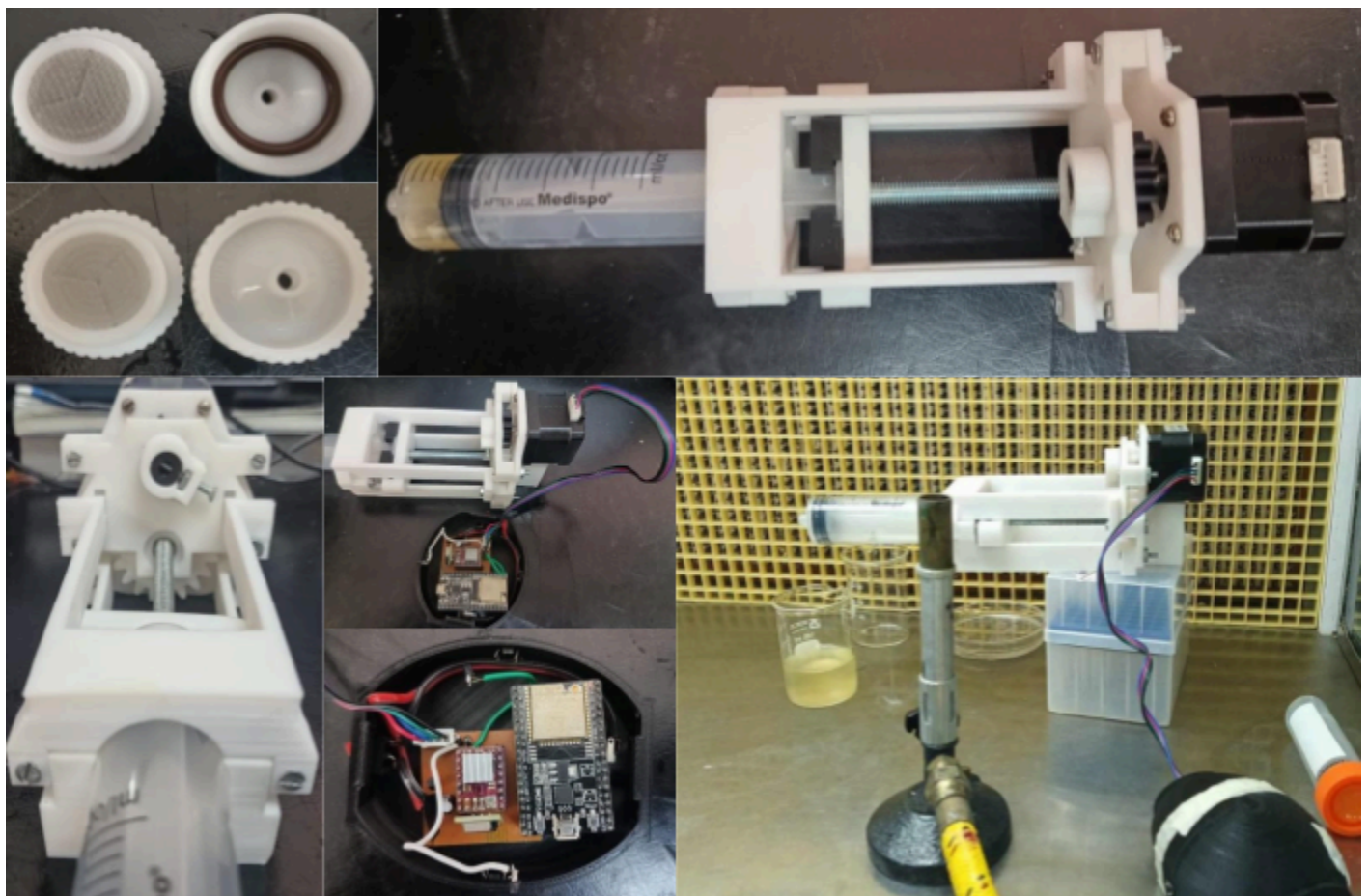
Zhang, J., & Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 407-421.
<https://doi.org/10.1007/s002530051411>

Zhang, J., Huang, S., Guo, H., Fane, A. G., & Tang, C. Y. (2022). Effects of crossflow filtration cell configuration on membrane separation performance and fouling behaviour. *Desalination*, 525, 115505. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2021.115505>

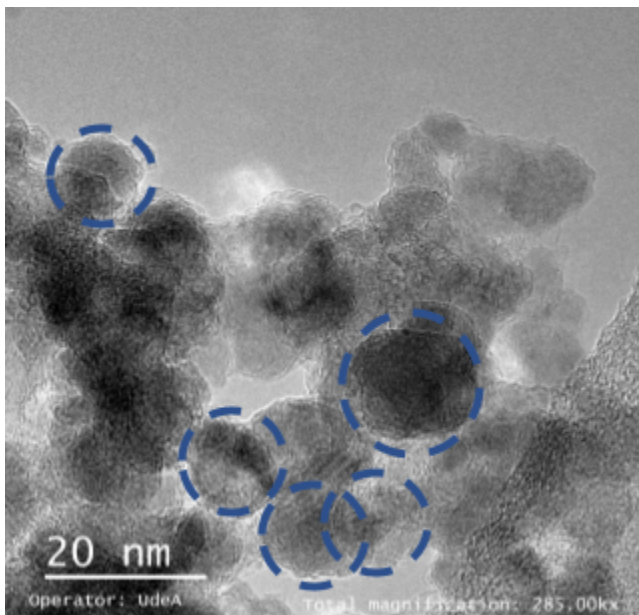
Zhang, K., Wang, M., Liu, T., Chu, Z., & Jin, W. (2022). Scalable Printing of Prussian Blue Analogue@Au Edge-Rich Microcubes as Flexible Biosensing Microchips Performing Ultrasensitive Sucrose Fermentation Monitoring. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(36), 40569-40578. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c09446>

ANEXOS.

ANEXO 1. EQUIPO DE PRUEBAS DE MICROFILTRACIÓN.

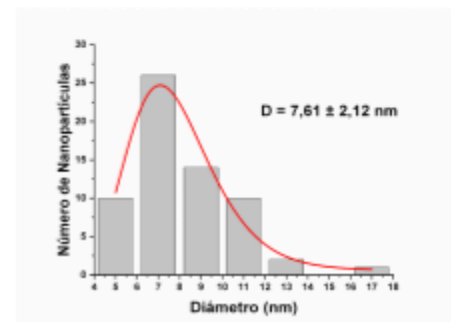
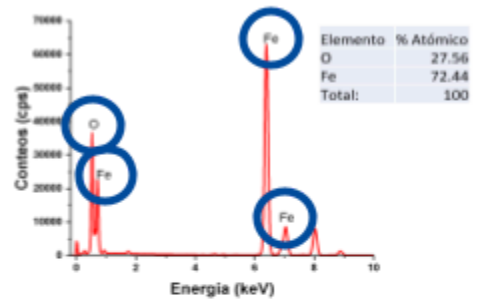


ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS

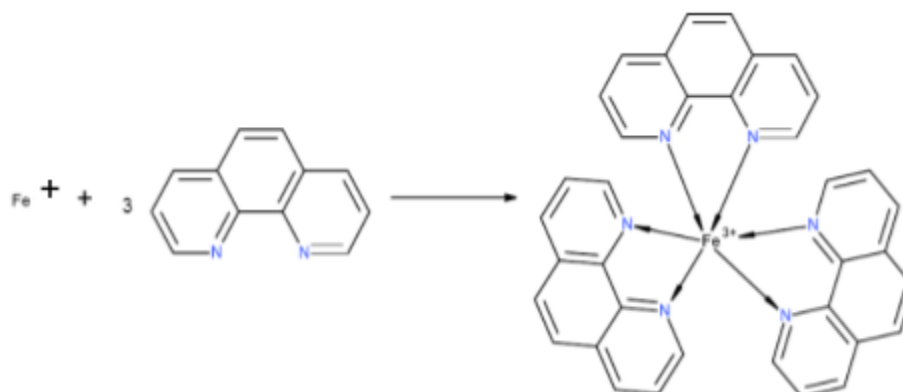
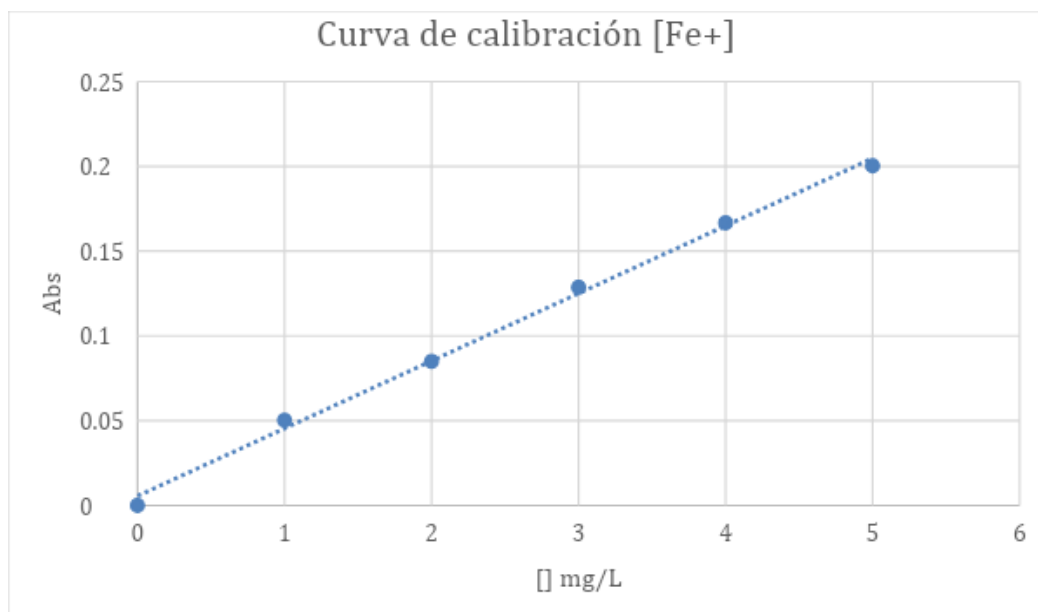


TEM

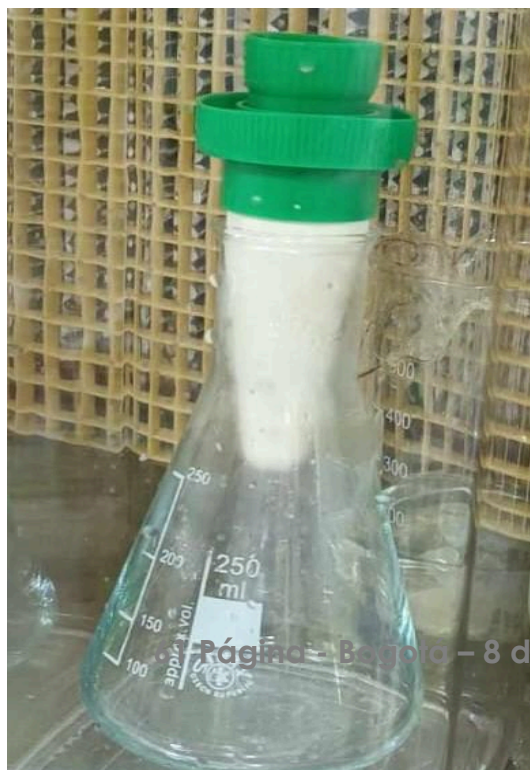
EDX



ANEXO 3. CURVA DE CALIBRACIÓN CONCENTRACIÓN DE Fe⁺ y FUNDAMENTO DEL TEST.

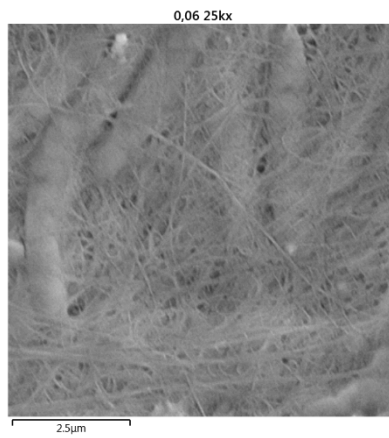


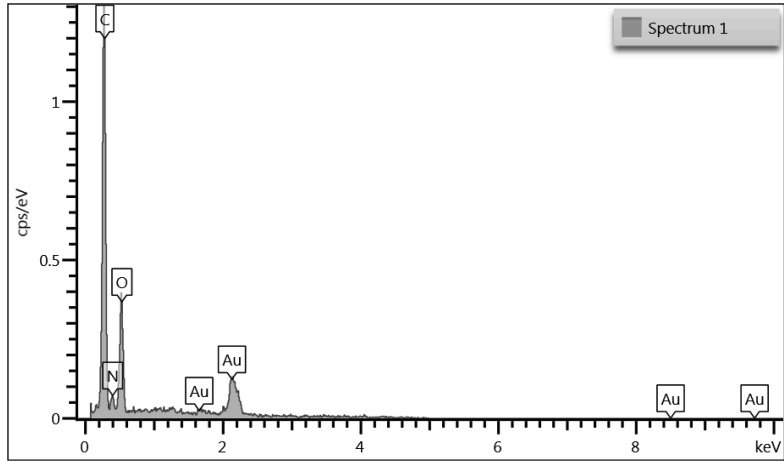
ANEXO 4. CONOS DE CERAMICA.



ANEXO 5. EDX

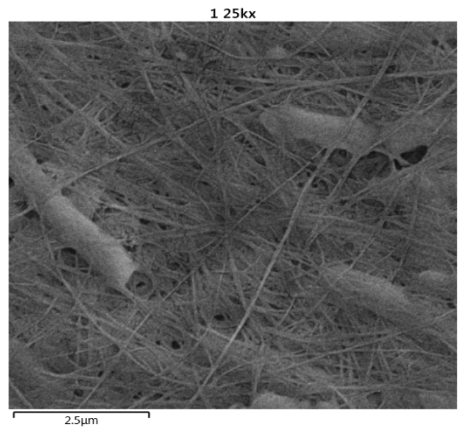
EDX 0,60%

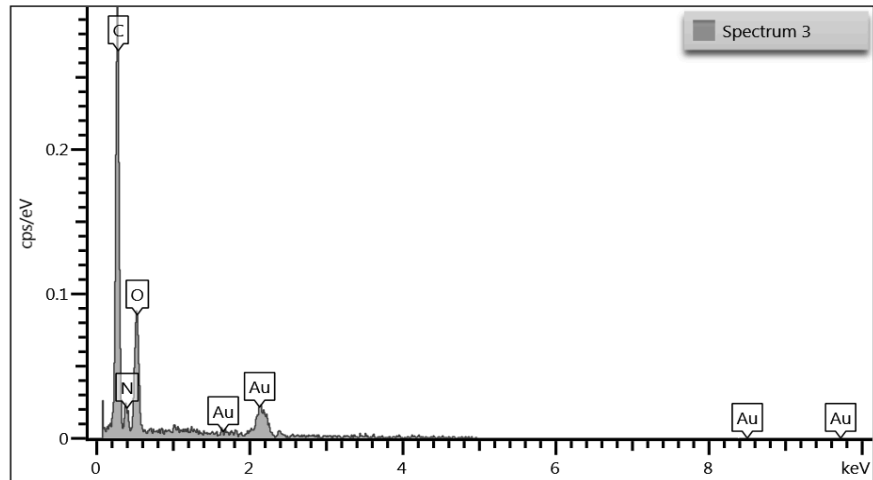




Element	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	44.32	2.74	69.61
N	6.52	1.43	8.79
O	15.60	1.29	18.39
Au	33.56	3.81	3.21
Total:	100.00		100.00

EDX 1%



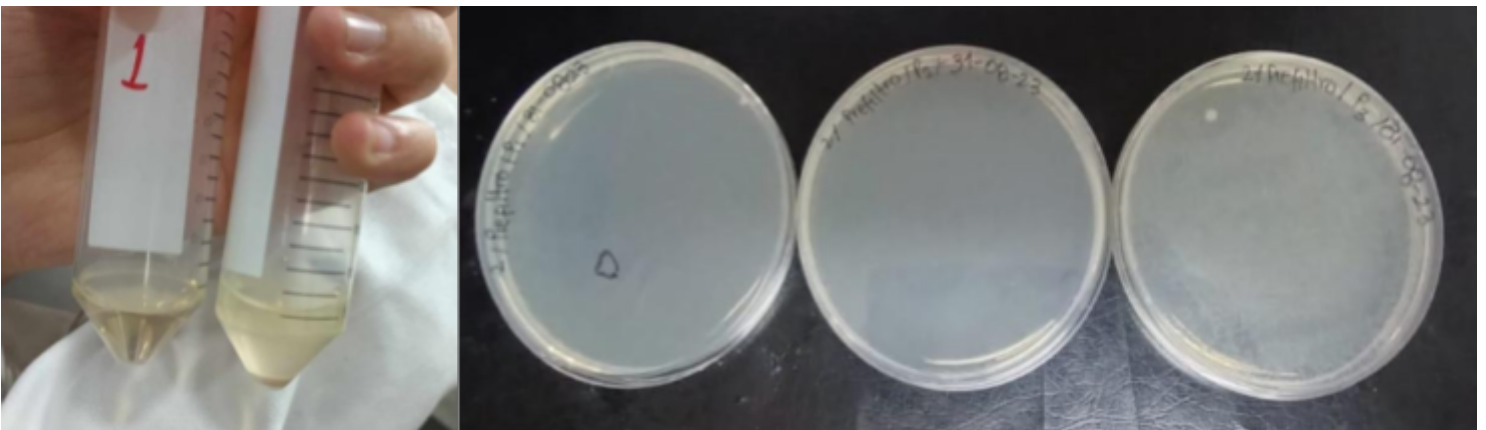


Element	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	42.07	1.68	72.61
N	3.51	0.77	5.20
O	13.83	0.73	17.92
Au	40.59	2.24	4.27
Total:	100.00		100.00

ANEXO 6. MONTAJE PARA EL PRETRATAMIENTO.



ANEXO 7. RESULTADOS PRETRATAMIENTO



ANEXO 8. MONTAJE DE NANOFILTRACIÓN



ANEXO 9. MEMBRANA POSTFILTRACIÓN DE UNA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO.



ANEXO 10. ARTICULO

Aislamiento de nanopartículas implementando membranas de celulosa bacteriana en una matriz simulada.

More Osorio, Laura Liliana ¹; Valderrama Rincón, Juan Daniel ²; Infante Matenzo, Ricardo Andrés³

¹ Universidad Antonio Nariño, Colombia, lmore91@uan.edu.co

² Universidad Antonio Nariño, Colombia, juan.valderrama@uan.edu.co

³ Universidad Antonio Nariño, Colombia, rinfante5@uan.edu.co

RESUMEN

La celulosa es una molécula biológica abundante en la naturaleza, obtenida de diversas fuentes, como plantas, hongos, bacterias y animales. Las bacterias Gram-Negativas, como *A. xylinum*, producen celulosa bacteriana, que se distingue por su pureza y propiedades biocompatibles, hipo-alérgicas y biodegradables. La celulosa bacteriana se ha utilizado en aplicaciones variadas, incluyendo el tratamiento de aguas residuales, purificación del aire y la creación de membranas selectivas. A pesar de todas estas características, no se ha explorado su potencial en la obtención de estructuras y partículas nanométricas de origen bacteriano, las cuales pueden ser de gran interés biotecnológico y farmacéutico; es por eso que el presente trabajo tuvo como propósito la obtención y evaluación de una membrana de celulosa bacteriana con propiedades de filtración con el fin de aislar nanopartículas en una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos de donde se obtienen dichas moléculas. Además, de proponer un protocolo que incluyó tres pasos para la obtención de moléculas de este tipo: pretratamiento, aislamiento y recuperación, dando resultados prometedores para su aplicación en matrices reales, lo que podría significar la disminución en los costos de producción y su posible su escalamiento.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, membranas, filtración por membranas, microfiltración, nanofiltración.

Isolation of Nanoparticles Using Cellulose Bacterial Membranes in a Simulated Matrix.

Abstract. *Cellulose is an abundant biological molecule in nature, obtained from various sources such as plants, fungi, bacteria, and animals. Gram-Negative bacteria, like A. xylinum, produce bacterial cellulose, known for its purity and biocompatible, hypoallergenic, and biodegradable properties. Bacterial cellulose has been used in various applications, including wastewater treatment, air purification, and the creation of selective membranes. Despite all these features, its potential in obtaining nano-sized structures and particles of bacterial origin, which can be of great biotechnological and pharmaceutical interest, has not been explored. Therefore, the purpose of this work was to obtain and evaluate a bacterial cellulose membrane with filtration properties to isolate nanoparticles in a matrix that simulates the conditions of the bacterial cultures from which these molecules are derived. In addition, a protocol was proposed that included three steps for obtaining molecules of this type: pretreatment, isolation, and recovery, yielding promising results for their application in real matrices, which could mean a reduction in production costs and possible scalability.*

Keywords: *Celulosa bacteriana, membranas, filtración por membranas, microfiltración, nanofiltración.*

1. INTRODUCCIÓN

La celulosa es la molécula biológica más abundante y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros en la tierra, siendo inclusive mayor que el de todos los demás juntos (Vandamme et al., 1998). Su estructura es lineal y está formada por la unión β -(1,4) de múltiples glucosas en cadenas no ramificadas, unidas entre sí con enlaces tipo puente de hidrógeno (Lima et al., 2015). La celulosa tiene una gran variedad de aplicaciones en distintas industrias como la papelera, textil, alimentaria, además de ser ampliamente utilizada en la fabricación de explosivos, productos médicos y biotecnológicos, así como que en la fabricación de membranas usadas como agentes de separación (Carreño Pineda et al., 2012).

En la actualidad, la celulosa se puede adquirir de múltiples fuentes: 1) vegetales, extraída de plantas leñosas (que posee un uso e importancia predominantes a nivel industrial)(Gutiérrez et al., 2005); 2) de organismos que abarcan distintos reinos, como los hongos (*Dictyostelium*), bacterias (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) y animales (*Tunicidae*); 3) mediante síntesis enzimática en entorno controlado (Lee et al., 1994) y 4) a través de síntesis química controlada a partir de derivados bencílicos de glucosa (Nakatsubo et al., 1996).

Los productores más eficientes de celulosa de origen bacteriano son las bacterias Gram-Negativas, *Acetobacter xylinum* y se caracteriza por la producción de BC de alta pureza y cristalización. BC es un material altamente versátil con una estructura microporosa en 3D que consiste en fibras entrecruzadas que forman una red compleja. Estas fibras que forman la estructura tridimensional dan lugar a una red de poros y espacios huecos retenidos que pueden variar en tamaño y distribución. La modificación de la estructura de la celulosa bacteriana se da al ajustar varios parámetros al momento del cultivo, como lo son la fuente de carbono, tiempo de cultivo y concentración de inóculo, dichas modificaciones en la estructura de la celulosa bacteriana hacen que sea un material atractivo para aplicaciones de separación en soluciones acuosas. Los poros y espacios huecos retenidos en su estructura permiten su uso en diversas técnicas de separación, como filtración, nanofiltración, diálisis, preiniciación por

vapor y evaporación, principalmente (Gullo et al., 2018).

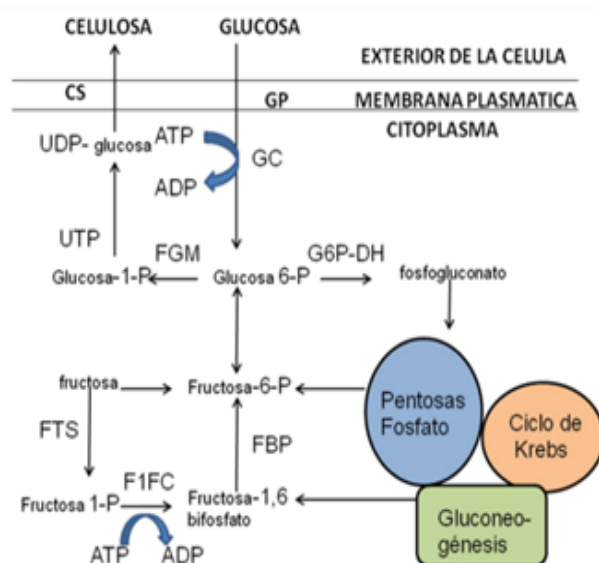


Figura 1. Vías Metabólicas del *A. xylinum*. CS: celulosa sintasa; FBP: fructosa bifosfatasa; FC:fructocinasa; F1FC: fructosa-1-p cinasa; FGI: fosfoglucoisomerasa; FGM:fosfoglucomutasa; FTS:fosfofructotransferasa; GC: glucocinasa; GP: glucosa permeasa; G6P-DH: glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP: uridin difosfato glucopirofosforilasa.

Tradicionalmente, la fuente de carbono más utilizada para la producción de BC es la dextrosa (glucosa) característica del medio H-S; sin embargo, se ha evaluado el rendimiento de la producción de celulosa, con el uso de otros azúcares como la sacarosa, la cual demuestró un aumento considerable de la síntesis de celulosa (Embuscado et al., 1994), aumentando el espesor y la resistencia de membrana (Bettlej et al., 2020). Otra de las fuentes comunes usadas para la síntesis de BC es el sorbitol, el cual es un alcohol de azúcar que a menudo se utiliza como fuente de carbono en el cultivo de bacterias productoras de celulosa; en particular, algunas cepas de bacterias mejoran la síntesis de celulosa bacteriana cuando se cultivan en medios que contienen sorbitol como fuente de carbono (Z. S. Ahmad & Munaim, 2018). La utilización de BC como material de filtración está en incremento, debido a que permite ser conjugada con otros elementos, lo que les confiere selectividad a moléculas específicas de acuerdo a su naturaleza química; como colorantes, metales pesados, aceites y grasas

en aguas residuales (Troncoso & Torres, 2020). Además, de algunos otros usos en su forma nativa, como purificación de soluciones de suero bovino, encontrando un porcentaje de retención entre el 67% y el 99% (Krystynowicz et al., 2000), la separación de polioles, clarificación de jugo de frutas (Pandey et al., 2005), pervaporación de mezclas etanol-agua (Dubey et al., 2002; Tiengson et al., 2002), eliminación de componentes aromáticos de frutas (Shibazaki et al., 1993), diálisis (George et al., 2005; Sokolnicki et al., 2006), premiación de gases (Clasen et al., 2006; Lima et al., 2015) y la eliminación de microplásticos de aguas residuales (Betlej et al., 2020).

Pese a las características físico-mecánicas muy favorables que presenta la BC, su rápida y fácil obtención, lo rentable que puede llegar a ser su implementación, ya que puede ser reutilizable, aún no se explora su utilización en el aislamiento y purificación de nanopartículas de origen bacteriano con interés biotecnológico y farmacéutico que pudiera hacer los procesos más rentables y con posibilidades de escalamiento. El presente trabajo se centró en la obtención y evaluación de una membrana de nanofiltración de BC con el propósito de aislar nanopartículas en una matriz que simula las condiciones de los cultivos bacterianos de los cuales se obtienen moléculas de interés biotecnológico.

2. MATERIALES Y METODO

Mantenimiento de la cepa de *Komagataeibacter xylinus*

Se inocularon colonias de *K. xylinum* en 250 ml de medio H-S en un erlenmeyer y encubadas a 30 °C durante 24 h. La fermentación se llevó a cabo inoculando 1% de caldo de cultivo en medios estándar (H-S). El cual era renovado cada 20 días para la obtención de inóculo activo fresco (Khattak et al., 2015).

Evaluación de condiciones de cultivo.

Día de incubación

La producción de BC se evaluó con diferentes tiempos de incubación. Aquí, se midieron tres diferentes tiempos de incubación del día 3 al día 5. Se inocularon colonias de *K. xylinum* en 50 ml de medio H-S en un matraz Erlenmeyer de 250 y encubadas a 30 C durante 24 h. La fermentación se llevó a cabo inoculando 1 % de caldo de cultivo en medio estándar (H-S). En un erlenmeyer de 250 ml, se mezclaron

homogéneamente y se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, el matraz se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con la suspensión de estera de celulosa (aproximadamente 1%) y los matraces se incubaron a 30 °C.

Fuente de carbono

La producción de CB se evaluó con diferentes sustratos. Aquí, la glucosa fue reemplazada por sacarosa 20 g/L y sorbitol 20 g/L y una modificación del H-S de la concentración de dextrosa 10 g/mL. Se utilizó medio H-S como control para la producción de BC. estos medios se mezclaron homogéneamente y se dividieron en vasos precipitados 250 ml en un volumen final de 150 ml de medio, se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente, se inocularon con la suspensión de estera de celulosa (aproximadamente 1%) y se incubaron a 30 °C durante 4 días en condiciones estáticas.

Concentración de inóculo

La producción de CB se evaluó con diferentes condiciones de inóculos. Se preparó el medio H-S tradicional, se mezclaron todos los componentes homogéneamente y se dividieron en vasos precipitados 250 ml en un volumen final de 150 ml de medio, se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente y se inocularon con la suspensión de estera de celulosa en concentraciones de inóculo de: 0.4%, 0.6%, 0.8% y 1% los matraces se incubaron a 30 °C durante 4 días en condiciones estáticas.

SEM.

La morfología de la celulosa bacteriana se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La preparación de las muestras consiste en dejar secar las membranas en una superficie de vidrio de 1 cm², las cuales debían estar completamente secas. Se recubrieron capas delgadas de muestras de BC con oro usando un recubridor de pulverización iónica, se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) de la marca Teascan modelo Lyra 3 con un espectrómetro de energía dispersa (EDS) con energías de excitación desde 0,1 kV hasta 30 kV que produce imágenes de gran aumento con alta resolución (de hasta 3 nm).

Consumo de sustrato

Para evaluar el consumo del sustrato, se realizó de manera indirecta utilizando DQO, desde el día 1 hasta el día 5 de incubación de las dos membranas seleccionadas, cada día se tomó

una alícuota del medio, se pasó por un filtro de perinola de 0.47 μm para retirar la carga bacteriana de la muestra y luego fue nuevamente filtrada mediante un filtro de 0.2 μm para intentar remover las fibras de celulosa que aún se encuentran inmersas en el medio, para la medición del DQO se utilizó el Kit de Hanna 93754A-25 y se calculó la relación con el consumo aproximado de la fuente de carbono a partir del DQO.

Preparación del medio de simulación para nanopartículas provenientes de origen bacteriano.

Para realización de la matriz de simulación, Se inculó un caldo LB con *e.coli* JC8031 a 37 °C por 18h en agitación constante, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 4500 RPM y durante 10 minutos, se agregó una suspensión de nanopartículas de Fe+ 5 mg/L las cuales son biocompatibles y no presentan características anti-microbianas.

Pretratamiento

Para el pretratamiento para el aislamiento de nanopartículas del medio simulado requiere eliminar efectivamente la carga bacteriana como proceso inicial, con el fin de hacer el sistema más rentable, se utilizó un cono de cerámica microporoso soportado sobre un recipiente para la recuperación de muestra. El cono cerámico microporoso es un dispositivo de riego automático para plantas comercial y fácil acceso económico y reutilizable. El cual es esterilizado antes de cada pretratamiento en autoclave a 121 °C durante 30 min y aislado en un recipiente hermético para garantizar la esterilidad del procedimiento. En este cono se vierte el medio simulado, y se deja filtrar por gravedad, para verificar que la eliminación de la carga bacteriana se realizó de manera correcta, se midió la densidad óptica antes y después de cultivo y se hizo un sembrado en placa en agar nutritivo.

Aplicación de membranas de ultrafiltración obtenidas en el aislamiento de nanopartículas implementando filtración al vacío.

Una vez realizado el pretratamiento se pasa al aislamiento de las nanopartículas, esto se realizó mediante la filtración al vacío. Se colocaron las membranas obtenidas a la placa interior de un embudo Büchner previamente esterilizado, como filtro, el cual se encontraba unido a un matraz Kitasato a través de un cono de goma. El tubo lateral del matraz Kitasato se conectó a una bomba de vacío. Con el fin de evaluar la capacidad de aislamiento y retención

de las nanopartículas en la película de ultrafiltración obtenidas, se realizó un lavado de la membrana con agua destilada, se centrifugó 30 minutos a 4500 rpm, eliminado el sobrenadante y diluyendo las partículas en 10 ml de agua para evaluar la concentración de las Nanopartículas recogidas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de una membrana de nanofiltración derivadas de BC capaces de aislar distintos tipos de nanopartículas, en especial las de origen bacteriano, se tomaron en cuenta las condiciones que principalmente modifican la estructura de BC y definen el grosor y el tamaño de poro como es el tiempo de cultivo, la fuente de carbono y la concentración de inóculo (Gullo et al., 2018). La evaluación de las membranas obtenidas se llevó a cabo mediante un enfoque escalonado. En primera instancia, se realizaron pruebas de microfiltración como un parámetro inicial de evaluación. Las membranas que demostraron la capacidad de retener eficazmente la carga bacteriana en estas pruebas se seleccionaron para la siguiente etapa. En la etapa siguiente, se llevaron a cabo pruebas de nanofiltración utilizando una solución de nanopartículas de hierro. Este paso se realizó para evaluar la capacidad de las membranas seleccionadas para retener partículas a una escala manométricas de manera eficiente.

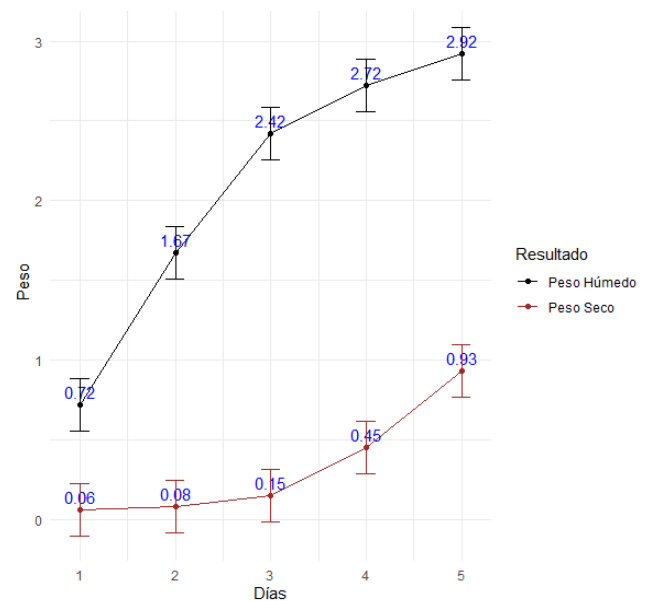


Figura 2. Producción de celulosa (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes tiempos de incubación.

La formación de la BC está altamente influenciada por el período de incubación del cultivo. En el día 0 ocurre la fase de adaptación, en esta fase las bacterias se adaptan al medio de cultivo e inician su multiplicación, por lo que la producción de celulosa es mínima y no se observa formación membrana (Nugroho et al., 2022). Del día 1 al día 3 ocurre la fase de logaritmo exponencial en donde las bacterias entran en su fase de crecimiento exponencial, lo que implica una rápida multiplicación, durante esta etapa, la producción de celulosa aumenta de manera significativa como se muestra en la figura 2, a partir del día 3 ya se obtienen membranas lo suficientemente consistentes para ser manipuladas (Singh et al., 2022). Posteriormente, una vez alcanzado el máximo nivel de producción de celulosa, el crecimiento bacteriano se desacelera, y las bacterias ingresan en la fase estacionaria, esta fase se da desde el día 4 hasta el día 7; en esta fase, la producción de celulosa continúa, aunque a un ritmo más pausado (Yanti et al., 2018). Si el cultivo se prolonga durante más de 7 días, se da la fase de declinación, durante esta etapa, la producción de celulosa disminuye aún más, y las bacterias entran en una fase de declinación que se asocia con el agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos de desecho (Yassine et al., 2016).

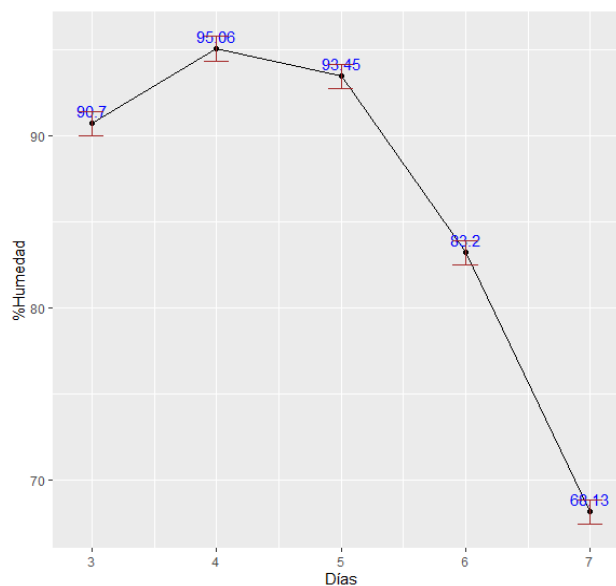


Figure 3. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes tiempos de incubación.

El porcentaje de humedad en la celulosa bacteriana varía en función del tiempo de incubación, en las fases iniciales del cultivo, la humedad es relativamente alta, como se observa en la figura 3, ya que las membranas tienen densidades y tamaños de poro altos lo que le permite retener mayor cantidad de agua, aumentando el porcentaje de humedad (Pynirtzi et al., 2023). A medida que el cultivo avanza hacia las fases estacionarias y de declinación, la celulosa pierde humedad, como se muestra en la figura 3, lo que da como resultado una disminución del porcentaje de humedad.

Tabla 1. Pruebas de microfiltrado días de incubación.

Días	D.O (I)	D.O (F)
3	0,806	0,0313 ± 0,003
4	1,032	0,0186 ± 0,0025
5	1,225	0,0133 ± 0,003

A partir del tercer día, al llevar a cabo las pruebas de filtrado, evaluando la disminución de la densidad óptica, como se muestra en la Tabla 1. Sin embargo, al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano, lo que sugiere que el período de tiempo transcurrido hasta el tercer día no es suficiente. A partir del cuarto día, las membranas ya han adquirido la capacidad necesaria para la remoción efectiva de la carga bacteriana.

Tabla 2. Pruebas de nanofiltración tiempos incubación.

A partir del cuarto día de incubación, las membranas obtenidas mostraron su capacidad para el aislamiento de nanopartículas, como se evidenció en las pruebas de nanofiltración. Esta capacidad quedó confirmada a través de una importante disminución de la concentración de hierro en las muestras después de su paso a través de las membranas de BC, como se muestra en la tabla 2. Este resultado muestra la capacidad de las membranas en la retención y filtración de nanopartículas a partir del cuarto día de incubación. De acuerdo con los resultados obtenidos, se establece que el

tiempo de incubación para la obtención de membranas BC para nanofiltración es de 4 días.

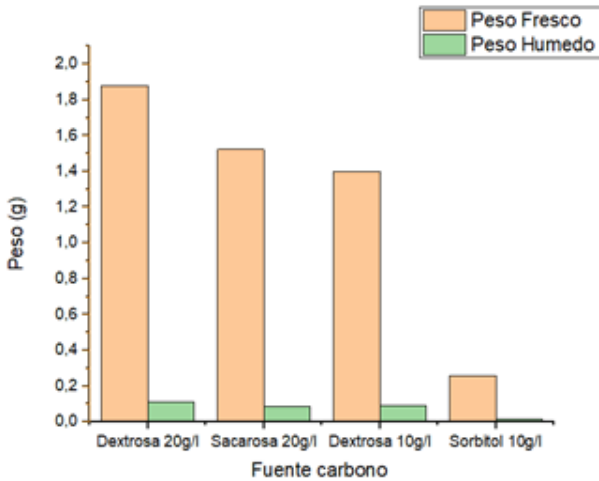


Figura 4. Producción de celulosa (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes fuentes de carbono.

La capacidad de filtración de las membranas de BC dependen del tamaño, distribución, densidad y conectividad de los poros, estas características se afectan directamente por la fuente de carbono que se utilice (Garcia et al., 2018). Los cambios en la concentración en las fuentes de carbono también pueden variar estos parámetros, ya que a medida que aumenta la concentración de carbono aumenta la densidad y conectividad de los poros, lo que dificultando el flujo a través de la membrana.

La utilización de sacarosa como fuente de carbono, dio como resultado una disminución en la producción de celulosa, como se ve en la figura 4, con respecto al control con dextrosa 20 g/L, esto puede ser debido a que la sacarosa es un disacárido compuesto por dos azúcares simples, glucosa y fructosa, unidos por una unión o-glucosídica, las bacterias deben separar esta unión y descomponer la sacarosa en dextrosa y fructosa, lo que requiere gasto energético adicional (K. Zhang et al., 2022). Por otra parte, la eficiencia del sorbitol en la producción de BC se vio disminuida en el caso de *G. xylinum*, esta disminución de eficiencia podría estar relacionada con el hecho de que el sorbitol, siendo un poliol o alcohol de azúcar, podría influir negativamente en las tasas de crecimiento bacteriano, lo que resulta en un proceso más lento. Esto, a su vez, llevó a que, al final del período de incubación elegido, se formara una película de celulosa extremadamente delgada y frágil que no fue

posible manipular para llevar a cabo las pruebas de microfiltrado.

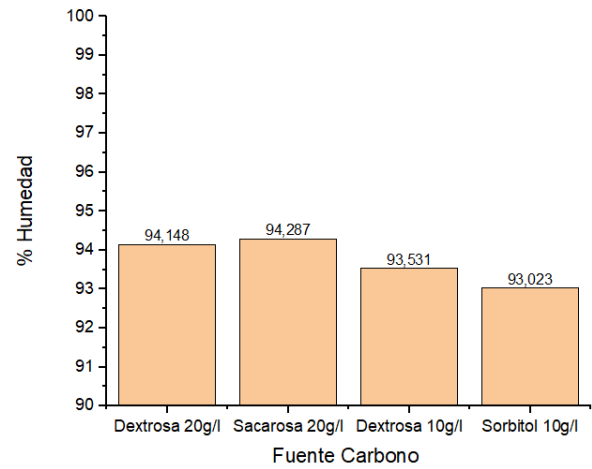


Figura 5. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes concentraciones de inóculo.

El porcentaje de humedad en la BC puede variar según la fuente de carbono, como se muestra en la figura 5, la sacarosa se caracteriza por presentar una distribución menos uniforme, con mayor tamaño, menor densidad y conectividad de los poros, lo que le permite retener más agua y tener un porcentaje de humedad mayor con respecto a la dextrosa, quien tiende a formar poros más pequeños y un entrelazado más uniforme que reduce su capacidad de retención de agua por lo que tiene un porcentaje de humedad menor.

Tabla 3. Pruebas de microfiltrado fuentes de carbono.

FC	D.O (l)	D.O (f)
Dextrosa20g/l	1,062	0,0163 ± 0,0015
Sacarosa20g/l	0,932	0,0343± 0,0071
Dextrosa10g/l	1,252	0,0256± 0,00007
Sorbitol 20g/l

Todas las fuentes de carbono evaluadas mostraron una notable reducción en la presencia de bacterias en el medio. Esto se correlaciona con una disminución de la

densidad óptica, como se muestra en la Tabla 3. Sin embargo, al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano en sacarosa al 20g/L y en dextrosa 10g/L, lo que sugiere que para la aplicación de nanofiltración con el menor tiempo de incubación se obtendrá mejores resultados implementando el medio H-S tradicional.

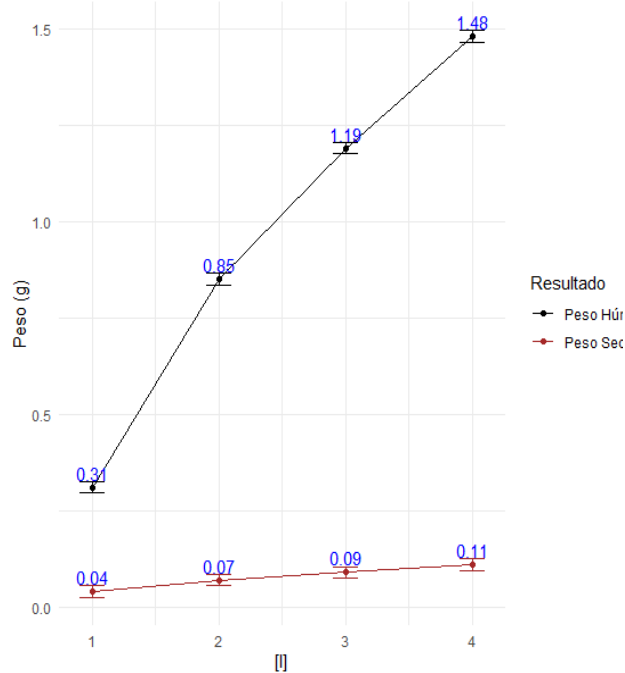


Figure 6. Producción de celulosa (g). Peso seco y peso húmedo de las membranas a diferentes concentraciones de inóculo.

Como se sabe, la concentración de inóculo afecta directamente las propiedades de porosidad y producción de BC. Un inóculo más concentrado da lugar a una mayor producción y disminuyendo la densidad de los poros de BC como se muestra en la figura 6, modificando la permeabilidad y en la capacidad de filtración de BC. Además, la concentración de inóculo también puede afectar el tamaño y la distribución de los poros en la membrana. Un inóculo más concentrado tiende a producir poros más pequeños y uniformemente distribuidos en la membrana, dando como resultado una estructura de poros más homogénea y una mayor uniformidad de las membranas.

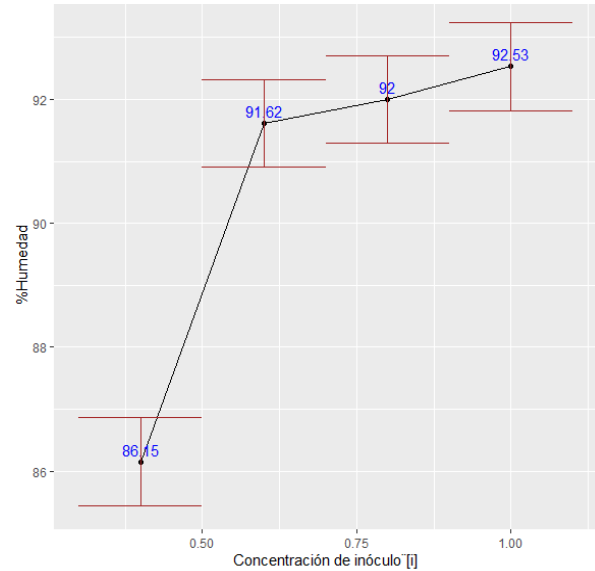


Figure 7. Porcentaje de humedad. Variación del % de humedad a diferentes concentraciones de inóculo

Tabla 4. Pruebas de microfiltrado concentración inóculo.

[I]	D.O (l)	D.O (f)
0,40%	0,806	0,058 ± 0,009
0,60%	1,032	0,018± 0,003
0,80%	1,225	0,0126± 0,002
1%	0,956	0,013 ± 0,0007

Al llevar a cabo las pruebas de filtrado, se puede observar que en todas las concentraciones de inóculo se presenta una reducción notable de bacterias presentes en el medio. Esto se correlaciona con una disminución de la densidad óptica, mostrada en la Tabla 4. Al realizar las pruebas de siembra en placa utilizando el filtrado obtenido, se observa crecimiento bacteriano únicamente en la concentración 0,40%, el resto de las membranas obtenidas fueron efectivas para la remoción de bacterias.

Tabla 5. Pruebas de nanofiltración concentración inoculo.

[I]	[Fe+]i mg/L	[Fe+]f mg/L
0,60%	25	1,523 ± 0,498
1%		0,603 ± 0,603

Como se puede observar en la Tabla 3, no se aprecian diferencias importantes en los resultados de los ensayos de microfiltración entre las concentraciones del 0,8% y el 1%. A partir de una concentración del 0,6% se evidencia la retención de nanopartículas Tabla 5. Por esta razón, se procedió a evaluar las características físico- mecánicas de membranas de BC obtenidas en un medio H-S tradicional, con un tiempo de incubación de 4 días, empleando concentraciones del inoculo del 0,6% y el 1%.

Los porcentajes de hinchamiento y compresibilidad son parámetros importantes que proporciona información sobre el comportamiento y la eficacia de la membrana de BC para filtración y separación; la capacidad de hinchamiento de CB, está directamente relacionada con la densidad y tamaño de los poros de la membrana, esto significa que entre mayor sea la porosidad y el tamaño de los espacios existentes, aumenta el porcentaje de hinchamiento (J. Zhang et al., 2022). Debido a que la BC es un material altamente poroso y que suele retener bastante humedad, genera porcentajes de hinchamiento mayor a 100% como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Compresibilidad e hinchamiento membranas BC.

MEMBRAN A	% DE COMPRESIBILIDAD	% DE HINCHAMIENTO
0,60%	38,44 ± 1,987	150,85 ± 2,207
1%	31,28 ± 0,724	131,63 ± 5,737

La aplicación de las membranas de BC nanofiltración implica que la membrana sea capaz de mantener su integridad y rendimiento bajo las condiciones de operación de altas presión y/o condiciones de vacío necesarias.

Los porcentajes de compresibilidad se encuentran por debajo del 50%, lo que indica que la membrana es resistente a la deformación bajo presión y/o vacío, como se muestra en la tabla 6, asegurando el mantenimiento de la red estructural de la membrana. Además, la baja compresibilidad contribuye a una vida útil más prolongada de la membrana, una mayor resistencia a la presión y una mayor eficiencia de separación, lo que podría permitir la reutilización de las membranas.

SEM

La morfología de la membrana de celulosa se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con esto se observó la distribución de los poros de las capas más superficiales y tamaño aproximado de las membranas obtenidas. Las membranas de CB en forma tridimensional en la Figura 8A y 8C se pudo observar la que las membranas obtenidas en la concentración de inoculo al 0,6% tienen una mayor densidad de poros en la membrana con respecto la concentración del 1%.

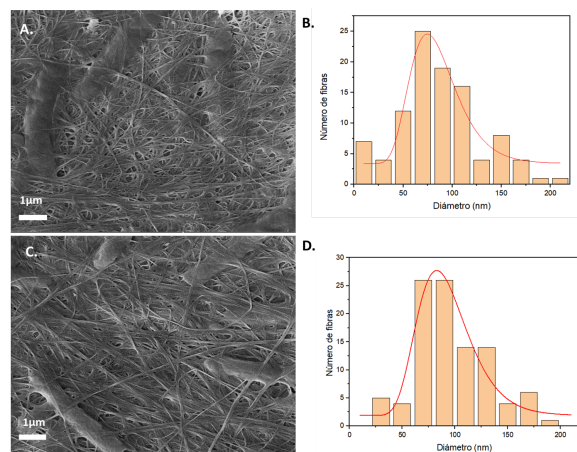


Figura 8. SEM. A. SEM 0,6%; B. Distribución de tamaños de fibra 0,6%; C. SEM 1%; D. Distribución de tamaños de fibra 1%.

El tamaño aproximado de las fibras de celulosa que se encuentran generadas es de 81,965 nm con una desviación 27,643 nm para el 0,6% como se muestra en la Figura 8B y de 89.645 nm con una desviación 26,723 nm como se muestra en la Figura 8D. Además de mostrar que la composición atómica de estas membranas en su mayoría es carbono, según lo mostrado en el EDX, lo que confirma la pureza de dichas membranas.

Capacidad de filtración

La eficiencia de las membranas en cuanto a la retención de nanopartículas es alta, con un porcentaje de un 99,964 % y el 99,981 % respectivamente como se muestra en la tabla 7, el porcentaje de retención es un indicador de la eficiencia de un proceso de filtración o separación, un porcentaje alto refleja la capacidad del sistema de filtración para el aislamiento de nanopartículas lo que permitirá su implementación en el aislamiento de biomoléculas de origen biológico.

Tabla 7. Porcentaje de retención.

Membrana	Velocidad (mL/min*cm ²)	[Fe ⁺]i (mg/L)	[Fe ⁺]f (mg/L)	% Retención
0,60%	0,059 ± 0,0034	50000	0,655 ± 0,076	99,964 ± 0,00427
			1,777 ± 0,213	99,987 ± 0,0405
1%	0,040 ± 0,0040			

Consumo de sustrato

El consumo de sustrato se midió de forma indirecta utilizando la Demanda Química de Oxígeno (DQO). La DQO tiene una relación empírica con la cantidad de gramos de glucosa y se basa en la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica presente en la muestra. La relación típica entre la DQO y los gramos de glucosa es de aproximadamente 2.67 g de glucosa por unidad de DQO.

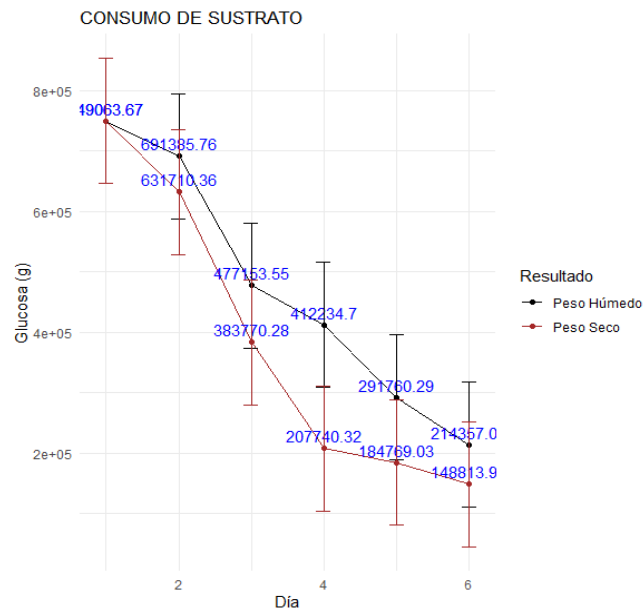


Figure 9. Consumo de sustrato. Cuantificación del sustrato por día de incubación de la membrana.

En la figura 9, se representa el consumo de la dextrosa a medida que avanza el cultivo. Para llevar a cabo este análisis se garantiza de que el valor de DQO obtenido fuera lo más representativo posible de la dextrosa que se encontraba en el medio. Por esta razón, se realizaron dos filtraciones, con el propósito de eliminar la carga bacteriana y algunas fibras de celulosa que aún no se unen a la membrana y están inmersas en el medio, los cuales también son materia orgánica y podrían afectar el resultado obtenido.

Tabla 8. Pretratamiento.

El procesamiento del medio que simula las condiciones presentes en un cultivo del cual se pueden obtener estructuras y partículas generadas por bacterias de interés biotecnológico con el fin de obtenerlas y aislarlas, requiere de tres etapas fundamentales, pretratamiento, aislamiento y recuperación, en la primera etapa se debe realizar un pretratamiento en el cual se debe asegurar la eliminación total de la carga microbiana. Para lograr esto, se implementó un

sistema de filtración por gravedad, usando conos de cerámica, los cuales son de fácil acceso, reutilizables, autoclavables y de bajo costo. Este pretratamiento demostró ser altamente prometedor en términos de eliminar la carga bacteriana, como se ilustra en la Tabla 7. En esta tabla, se puede observar una notable reducción en la densidad óptica luego de aplicado el pretratamiento. Además, al llevar a cabo pruebas de siembra en placas, no se ha evidenciado crecimiento bacteriano.

Tabla 9. Aislamiento de nanopartículas.

Una vez se asegura la eliminación de la carga bacteriana, se procede al aislamiento. Este proceso se inicia con una concentración inicial de 5 mg/L de nanopartículas de Fe⁺. Para facilitar la etapa de filtrado, se emplea un sistema de vacío, lo que permite facilitar el paso de medio a través de la membrana debido a la compleja estructura tridimensional con la que cuenta. Esto, a su vez, conduce a una notable reducción en el tiempo requerido para el proceso de filtrado, al tiempo que se mantiene la esterilidad del sistema en todo momento. La Tabla 9 confirma muestra que el aislamiento de las nanopartículas de Fe⁺ del medio fue bastante bueno.

En el contexto de los procesos de filtración, la etapa de recuperación se convierte en un punto crítico para la obtención eficaz de los componentes deseables previamente retenidos en las membranas, lo que, a su vez, facilita su posterior aprovechamiento o procesamiento. Este aspecto cobra una importancia en aplicaciones de biotecnología, donde la eficiencia del proceso de recuperación es un importante. En esta área, la recuperación debe garantizar la obtención de los productos con un alto grado de pureza y rendimiento.

Tabla 10. Recuperación de nanopartículas.

Membranas	[Fe ⁺] mg/L recuperado
0,60%	9,344 ± 0,98
1%	11,17 ± 1,10

Mediante la combinación de técnicas que incluyen el lavado de las membranas, la centrifugación y la reconcentración, se ha logrado una mejora sustancial en la

recuperación de partículas que retenidas en las membranas. Como se observa en la tabla 10 se logró una mejor recuperación en la membrana del 1%, en comparación con la del 0,06%. Estos resultados sugieren que la metodología utilizada tiene un potencial prometedor para su aplicación en matrices reales, lo que a su vez podría conllevar una reducción sustancial de los costos en la producción y su modificación de acuerdo a las moléculas objetivos.

4. CONCLUSIONES

Membranas	[Fe ⁺]i (mg/L)	[Fe ⁺]f (mg/L)
0,60%	5	0,78± 0,13
1%		0,35±0,12

- La facilidad para modificar el tamaño y densidad de poro con la modificación de las condiciones de cultivo hace que se pueda pensar en su utilización para sistema de filtrados de moléculas específicas, ya sean de distintos tamaños y/o especies químicas.

- Las características físico-químicas óptimas que presentan las membranas obtenidas, le permiten soportar grandes presiones sobre ellas sin variar mucho su masa, muestran que pueden ser utilizadas varias veces antes de perder sus propiedades de retención, además son resistentes deformación y daño por rupturas.

- El tratamiento de las membranas mediante lavados con agua destilada y la utilización de etanol al 70% se demostró altamente efectivo para eliminar los residuos bacterianos que se acumulan durante la síntesis bacteriana de la celulosa. Este enfoque no solo resulta en una reducción de los costos de producción, sino que también es amigable con el medio ambiente al eliminar la necesidad de utilizar hidróxido de sodio y especies de cloro en el proceso.

- El proceso de aislamiento y recuperación de nanopartículas a través de membranas de BC ha demostrado ser altamente efectivo, con una eficiencia de retención superior al 99%. Este enfoque ofrece un gran potencial para su aplicación en campos

tan diversos como la biotecnología y la farmacología.

- El sistema de pretratamiento utilizado es una excelente alternativa para hacer más económico y óptimo el aislamiento y purificación de las partículas de interés, debido a que es comercial, de fácil acceso, reutilizable y de fácil esterilización.
- La estandarización del sistema, que abarca el pretratamiento, aislamiento y recuperación para la purificación y obtención de estructuras, moléculas o partículas de origen bacteriano de relevancia en el ámbito biotecnológico y farmacéutico, podría permitir una reducción sustancial de los costos energéticos y de producción que actualmente caracterizan la obtención comercial de estos elementos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M., Ahmed, S., Swami, B. L., & Ikram, S. (2015). Adsorption of heavy metal ions: Role of chitosan and cellulose for water treatment. *Langmuir*, 79, 109-155.

Ahmad, Z. S., & Munaim, M. S. A. (2018). Effect of time, moisture content, and substrate amount on sorbitol production using entrapment of *Lactobacillus plantarum* (BAA-793) in sodium alginate beads. *Food Bioscience*, 21, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.002>

Barraque, C., Bebin, J., Bernard, J., & Marmagne, J. (1979). Manual técnico del agua. Capítulo 9: Filtración.

Betej, I., Salerno-Kochan, R., Krajewski, K. J., Zawadzki, J., & Boruszewski, P. (2020). The influence of culture medium components on the physical and mechanical properties of cellulose synthesized by kombucha microorganisms. *BioResources*, 15(2), 3125-3135. <https://doi.org/10.15376/biores.15.2.3125-3135>

Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C.-C., Verma, V., Wang, H.-T., Ismajli, S., & Cheng, K.-C. (2020). Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 397-414. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review. *Cellulose*, 23(1), 57-91. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>

Campbell, M. K., Farrell, S. O., Reyes, A. C., Gasco, J. H. C., Talavera, J. B., Bonilla, A. C., & Muñoz, G. R. (2004). *Bioquímica* (Vol. 4). Thomson.

Carreño Pineda, L. D. (2011). Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana.

Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A. C. M., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: Una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307-335. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.8.16.12>

Chao, Y. -p., Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., & Shoda, M. (1997). [No title found]. *Biotechnology Techniques*, 11(11), 829-832. <https://doi.org/10.1023/A:1018433526709>

Chávez-Pacheco, J. L., & Martínez-Yee, S. (2004). CELULOSA BACTERIANA EN GLUCONACETOBACTER XYLINUM: BIOSÍNTESIS Y APLICACIONES. 7(1), 9.

Ciardelli, G., Corsi, L., & Marcucci, M. (2001). Membrane separation for wastewater reuse in the textile industry. *Resources, Conservation and Recycling*, 31(2), 189-197. [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(00\)00079-3](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(00)00079-3)

Clasen, C., Sultanova, B., Wilhelms, T., Heisig, P., & Kulicke, W. (2006). Effects of different drying processes on the material properties of bacterial cellulose membranes. 244(1), 48-58.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown Jr, R. M. (2006). Microbial cellulose—The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145-151.

Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R. malcolm. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3/4), 403-411. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>

dos Reis Coimbra, J. S., & Teixeira, J. A. (2016). *Engineering aspects of milk and dairy products*. CRC Press.

Dubey, V., Saxena, C., Singh, L., Ramana, K. V., & Chauhan, R. S. (2002). Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 27(2), 163-171. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(01\)00210-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(01)00210-6)

Embuscado, M. E., Marks, J. S., & BeMiller, J. N. (1994). Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocolloids*, 8(5), 407-418. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80084-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2)

García, N. L., Ribba, L., Cimadoro, J. D., & Goyanes, S. (2018). Electrospun mat swelling: An ally to improve membrane rejection ratio. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 09. <https://doi.org/10.4172/2157-7048-C1-012>

Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., & Peijs, T. (2011). Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technology*, 102(19), 9105-9110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.077>

George, J., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N., Jagannath, J. H., & Bawa, A. S. (2005). Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International journal of biological macromolecules*, 37(4), 189-194.

Gullo, M., La China, S., Falcone, P. M., & Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6885-6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>

Gutiérrez, I., Zuluaga, R., Cruz, J., & Gañán, P. (2005). Influence of steam treatment on the structure and physical-mechanical behavior of plantain fibers. *Información Tecnológica*, 16(2), 15.

Ha, J. H., & Park, J. K. (2012). Improvement of bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum* using byproduct produced by *Gluconacetobacter hansenii*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29, 563-566.

Han, N. S., & Robyt, J. F. (1998). The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: Direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. *Carbohydrate Research*, 313(2), 125-133. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00253-5)

Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345.

Hu, Y., Catchmark, J. M., & Vogler, E. A. (2013). Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and Their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth. *Biomacromolecules*, 14(10), 3444-3452. <https://doi.org/10.1021/bm400744a>

- Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., & Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21(1), 1-30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: A review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 183-188. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80199-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80199-6)
- Ibáñez Lorente, R. (2007). Estudio de la ultrafiltración de proteínas modelo con membranas cerámica.
- Jung, H.-I., Jeong, J.-H., Lee, O.-M., Park, G.-T., Kim, K.-K., Park, H.-C., Lee, S.-M., Kim, Y.-G., & Son, H.-J. (2010). Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresource technology*, 101(10), 3602-3608.
- Jung, J. Y., Park, J. K., & Chang, H. N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.019>
- Keshk, S. (2006). Physical properties of bacterial cellulose sheets produced in presence of lignosulfonate. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.038>
- Khan, A. W., & Colvin, J. R. (1961). Isolation of the precursor of bacterial cellulose. *Journal of Polymer Science*, 51(155), 1-9. <https://doi.org/10.1002/pol.1961.1205115501>
- Khattak, W. A., Khan, T., Ul-Islam, M., Wahid, F., & Park, J. K. (2015). Production, Characterization and Physico-mechanical Properties of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(1), 45-53. <https://doi.org/10.1007/s10924-014-0663-x>
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 318-321. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)85682-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)85682-6)
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kaminoyama, M., & Kamiwano, M. (1996). Characterization of non-newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 382-386. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89155-0](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89155-0)
- Krystynowicz, A., Bielecki, S., Czaja, W., & Rzycka, M. (2000). Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. *En Progress in Biotechnology* (Vol. 17, pp. 323-327). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(00\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(00)80088-X)
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Mikiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189-195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Abdul Kari, Z., Mohd Noor, N. H., & Ray, R. R. (2021). Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12984. <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>
- Le-Clech, P., Chen, V., & Fane, T. A. G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), 17-53. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.08.019>
- Lee, J. H., Brown, R. M., Kuga, S., Shoda, S., & Kobayashi, S. (1994). Assembly of synthetic cellulose I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7425-7429. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7425>
- Lehtonen, J., Chen, X., Beaumont, M., Hassinen, J., Orelma, H., Dumée, L. F., Tardy, B. L., & Rojas, O. J. (2021). Impact of incubation conditions and post-treatment on the properties of bacterial cellulose membranes for pressure-driven filtration. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117073. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117073>
- Lima, L. R., Santos, D. B., Santos, M. V., Barud, H. S., Henrique, M. A., Pasquini, D., Pecoraro, E., & Ribeiro, S. J. (2015). Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. *Química Nova*, 38, 1140-1147.
- Lu, H., & Jiang, X. (2014). Structure and Properties of Bacterial Cellulose Produced Using a Tricking Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 3844-3861. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0795-4>
- Ma, C., Jiang, F., Ma, Y., Wang, J., Li, H., & Zhang, J. (2019). Isolation and Detection Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer Diagnostic. *Dose-Response*, 17(4), 155932581989100. <https://doi.org/10.1177/1559325819891004>
- Marx-Figini, M., & Pion, B. G. (1974). Kinetic investigations of biosynthesis of cellulose by *Actobacter xylinum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 338(2), 382-393. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90299-2)
- Mkumbaye, S. I., Minja, D. T. R., Jespersen, J. S., Alifrangis, M., Kavishe, R. A., Mwakalinga, S. B., Lusingu, J. P., Theander, T. G., Lavtsen, T., & Wang, C. W. (2017). Cellulose filtration of blood from malaria patients for improving ex vivo growth of *Plasmodium falciparum* parasites. *Malaria Journal*, 16(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1714-2>
- Moosavi-Nasab, M., & Yousefi, A. R. (2010). Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 44, 1258-1263.
- Mormino, R., & Bungay, H. (2003). Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6), 503-506. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1377-5>
- Nakatsubo, F., Kamitakahara, H., & Hori, M. (1996). Cationic ring-opening polymerization of 3, 6-di-O-benzyl- α -D-glucose 1, 2, 4-orthopivalate and the first chemical synthesis of cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 118(7), 1677-1681.
- Nugroho, D. A., Sutiarso, L., Rahayu, E. S., & Masithoh, R. E. (2022). Kinetics observations of bacterial cellulose thickness formation using imageprocessing approach during the fermentation process. *Food Research*, 6(1), 210-214. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(1\).093](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(1).093)
- Nunes, S. P., & Peinemann, K.-V. (2001). *Membrane technology*. Wiley Online Library.
- Ortiz, M. M. M., & Hernández, J. M. (2004). Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 26-34.
- Pandey, L. K., Saxena, C., & Dubey, V. (2005). Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 42(3), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.07.014>
- Phulara, S. C., Chaturvedi, P., Chaurasia, D., Diwan, B., & Gupta, P. (2019). Modulation of culture medium confers high-specificity production of isopentenol in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(4), 458-464. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.002>
- Pynirtzi, N., Debnath, K. B., Lantzanakis, G., Bloch, K., Scott, J., Davie, C., & Bridgens, B. (2023). Evaluating the Humidity Responsiveness of Bacterial Cellulose for Application in Responsive, Breathable Building Skins. *En S.*

- Amziane, I. Merta, & J. Page (Eds.), *Bio-Based Building Materials* (Vol. 45, pp. 640-652). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-33465-8_49
- Rani, M. U., & Appaiah, A. (2011). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology*, 61(4), 781-787. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0196-7>
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6(1), 12-19.
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35-58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>
- Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F., & Usuda, M. (1993). Bacterial cellulose membrane as separation medium. *Journal of Applied Polymer Science*, 50(6), 965-969. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070500605>
- Singh, M. K., Singh, A., & Pandey, A. (2022). Optimization of Bacterial Cellulose Production Using Jaggery Waste by Response Surface Method [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1780504/v1>
- Sokolnicki, A. M., Fisher, R. J., Harrah, T. P., & Kaplan, D. L. (2006). Permeability of bacterial cellulose membranes. *Journal of membrane science*, 272(1-2), 15-27.
- Soriano Bartolo, A. (2001). Investigación sobre el empleo de membranas en tratamientos terciarios de desinfección.
- Sperotto, G., Stasiak, L. G., Godoi, J. P. M. G., Gabiatti, N. C., & De Souza, S. S. (2021). A review of culture media for bacterial cellulose production: Complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose*, 28(5), 2649-2673. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5>
- Suárez Díez, L. (2014). Reutilización de detergentes industriales: Aplicación de la tecnología con membranas en disoluciones modelo de detergentes.
- Sun, B., Lin, J., Liu, M., Li, W., Yang, L., Zhang, L., Chen, C., & Sun, D. (2022). In Situ Biosynthesis of Biodegradable Functional Bacterial Cellulose for High-Efficiency Particulate Air Filtration. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(4), 1644-1652. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c07532>
- Suryanto, H., Kurniawan, F., Syukri, D., Binoj, J. S., Hari, P. D., & Yanuhar, U. (2023). Properties of bacterial cellulose acetate nanocomposite with TiO₂ nanoparticle and graphene reinforcement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123705. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123705>
- Tiongson, J., Bugante, E., & Del Rosario, E. (2002). Development of ultrafiltration membranes from bacterial cellulose (nata de coco) for the separation of mango volatile organic compounds. *Philippine Agricultural Scientist*.
- Troncoso, O. P., & Torres, F. G. (2020). Bacterial Cellulose—Graphene Based Nanocomposites. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6532. <https://doi.org/10.3390/ijms21186532>
- Urbina, L., Guaresti, O., Requies, J., Gabilondo, N., Eceiza, A., Corcuera, M. A., & Retegi, A. (2018). Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters. *Carbohydrate Polymers*, 193, 362-372. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.007>
- Vandamme, E., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer degradation and stability*, 59(1-3), 93-99.
- Villalobos, A. C. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*, 243-264.
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). [No title found]. *Cellulose*, 5(3), 187-200. <https://doi.org/10.1023/A:1009272904582>
- Williams, W. S., & Cannon, R. E. (1989). Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2448-2452. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2448-2452.1989>
- Yang Hu & Jeffrey M Catchmark. (2010). Studies on Sphere-like Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* under Agitated Culture. 2010 Pittsburgh, Pennsylvania, June 20 - June 23, 2010. 2010 Pittsburgh, Pennsylvania, June 20 - June 23, 2010. <https://doi.org/10.13031/2013.29706>
- Yanti, N. A., Ahmad, S. W., & Muhiddin, N. H. (2018). Evaluation of inoculum size and fermentation period for bacterial cellulose production from sago liquid waste. *Journal of Physics: Conference Series*, 1116, 052076. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1116/5/052076>
- Yassine, F., Bassil, N., Chokr, A., El Samrani, A., Serghei, A., Boiteux, G., & El Tahchi, M. (2016). Two-step formation mechanism of *Acetobacter cellulose* biofilm: Synthesis of sparse and compact cellulose. *Cellulose*, 23(2), 1087-1100. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0884-3>
- Zakaria, J., & Nazeri, M. (2012). Optimization of bacterial cellulose production from pineapple waste: Effect of temperature, pH and concentration. 5th engineering conference, "engineering towards change-empowering green solutions."
- Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506-513.
- Zhang, J., & Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 407-421. <https://doi.org/10.1007/s002530051411>
- Zhang, J., Huang, S., Guo, H., Fane, A. G., & Tang, C. Y. (2022). Effects of crossflow filtration cell configuration on membrane separation performance and fouling behaviour. *Desalination*, 525, 115505. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2021.115505>
- Zhang, K., Wang, M., Liu, T., Chu, Z., & Jin, W. (2022). Scalable Printing of Prussian Blue Analogue@Au Edge-Rich Microcubes as Flexible Biosensing Microchips Performing Ultrasensitive Sucrose Fermentation Monitoring. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(36), 40569-40578. <https://doi.org/10.1021/acssami.2c09446>