

EFFECTO DE LA SACAROSA EN LA SÍNTESIS DE CELULOSA BACTERIANA POR FERMENTACIÓN DE KOMBUCHA EN TÉ NEGRO (*CAMELLIA SINENSIS*)

Natanael Victoriano-Huerta¹, Salvador Alcántara-Iniesta¹, Blanca Susana Soto-Cruz^{1*}, Plácido Zaca-Morán²,
Abdu Orduña-Díaz³, Leslie Susana Arcila-Lozano³ Marlon Rojas-López^{3*}

¹Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores, Instituto de Ciencias de la Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla, Ed. IC5 o IC6, Col. San Manuel, 72570 Puebla, México.

²Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ecocampus Valsequillo, 72960,
Puebla, México.

³ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-Tlaxcala,
Carretera estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla, Tepetitla, 90700, Tlaxcala, México

RESUMEN

Se sintetizaron membranas de celulosa bacteriana mediante fermentación líquida de la cepa Kombucha en té negro (*Camellia sinensis*) a diferentes concentraciones de sacarosa. Propiedades estructurales de la celulosa bacteriana Kombucha, tales como el índice de orden lateral (LOI), el índice total de cristalinidad (TCI), la intensidad de los enlaces de hidrógeno (HBI), la fracción ($f\alpha$), así como su dependencia con el contenido de sacarosa fueron evaluadas mediante espectroscopia FTIR, utilizando distintas bandas de absorción del espectro vibracional. Se observó así que la sacarosa tiende a cristalizar a la celulosa bacteriana, debido al aumento del índice total de cristalinidad y de orden lateral, así como de la fracción ($f\alpha$), mientras que el índice de enlaces de hidrógeno disminuyó. La adición de cacao orgánico (*Theobroma cacao*) en el medio de cultivo previo a la fermentación produjo membranas con propiedades muy similares a las preparadas solamente con té negro. La obtención de celulosa tipo I y la cristalización controlada por este proceso podrían contribuir a la obtención de membranas de alta cristalinidad para aplicaciones biomédicas y bioelectrónicas.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, propiedades estructurales, índice total de cristalinidad, índice de orden lateral, intensidad de enlaces de hidrógeno, espectroscopia FTIR.

ABSTRACT

Bacterial cellulose membranes were synthesized by liquid fermentation of the Kombucha strain into black tea (*Camellia sinensis*) at different concentrations of sucrose. Structural properties of bacterial cellulose Kombucha, such as lateral order index (LOI), total crystallinity index (TCI), hydrogen bond intensity (HBI), fraction ($f\alpha$), as well as their dependence on sucrose content were evaluated by FTIR spectroscopy, using different absorption bands of the vibrational spectrum. Thus, sucrose tends to crystallize bacterial cellulose, due to the increase in the total index of crystallinity and lateral order, as well as the fraction ($f\alpha$), while the index of hydrogen bonds decreased. The addition of organic cocoa (*Theobroma cacao*) in the culture medium prior to fermentation produced membranes with properties very similar to those prepared only with black tea. Obtaining type I cellulose and crystallization controlled by this process could contribute to obtaining high crystallinity membranes for biomedical and bioelectronic applications.

Keywords: Bacterial Cellulose; structural properties; total crystallinity index, lateral order index, hydrogen bond intensity, FTIR spectroscopy.

Corresponding authors: blanca.sotocruz@viep.com.mx, marlonrl@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

La celulosa bacteriana de Kombucha (KBC) es una membrana delgada biodegradable obtenida de la fermentación del té negro (*Camellia sinensis*), sacarosa, y el cultivo microbiano conocido como SCOBY (Cultivo simbiótico de bacterias y levaduras), que tiene la consistencia de un gel y está compuesta de un consorcio de bacterias del género *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Leuconostoc*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae*, *Enterococcus*, *Thermus* (Angela et al. 2020; Domskiene et al. 2019; Mukadam et al. 2016; Zhu et al. 2014) así como levaduras como *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces* (Kaewkod et al. 2019; Leal et al. 2018). Así, esta membrana posee características únicas como alta pureza, biocompatibilidad, biodegradabilidad, (Jacek et al. 2021; Revin et al. 2018), alta capacidad de absorción de agua y por tanto mayor adaptabilidad biológica (Popa et al. 2022), así como alta resistencia a la tensión (Bardone et al. 2018). Las microfibrillas de KBC son 100 veces más pequeñas en comparación con la celulosa vegetal (Ruka et al. 2012), lo que le otorga una micro/nanoestructura tridimensional única, aumentando su interés en biotecnología, biomedicina, alimentos, electrónica, bioelectrónica, nanocompuestos y otras aplicaciones entre las que se encuentran la regeneración de tejido y cicatrización (Esa et al. 2014).

En este trabajo, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para analizar las propiedades estructurales de la celulosa bacteriana de Kombucha, tales como el índice de orden lateral, el índice de cristalinidad total, la intensidad de los enlaces de hidrógeno, la fracción α y su dependencia con la concentración de sacarosa y con la composición del medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Té negro orgánico marca Molienda Sagrada para infusión que servirá como medio de cultivo para la obtención de celulosa bacteriana por SCOBY Kombucha. Sacarosa de grado reactivo de la marca Meyer, extracto de polvo de levadura de la marca Himedia. Peptona grado bacteriológico marca Meyer. Para realizar la limpieza de las KBC formadas se utilizó Hidróxido de Sodio (NaOH) en hojuelas grado reactivo, marca Meyer, y en todos los procesos se utilizó agua destilada marca PiSA.

Preparación de membranas de celulosa bacteriana por Kombucha (KBC y KBC-cacao)

Se elaboraron dos tipos de medio de cultivo, ambos contienen té negro al 1% el cual se vierte en 1L de agua hirviendo durante 5 minutos dejando enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se emplean cuatro concentraciones de sacarosa (5, 10, 15 y 20 %). Además, se añadieron 1 g/L de

peptona y 10 g/L de extracto de levadura. Al segundo medio se le agregó cacao orgánico (*Theobroma cacao*) 10 g/L, ambos medios contienen la misma concentración de sacarosa. Del medio obtenido se vierten 100 mL de la infusión en frascos cilíndricos de vidrio de 175 mL. A continuación, las muestras (KBC y KBC-cacao) se esterilizaron a 121 °C durante 15 min y se mide el pH. Posteriormente, se utilizó una incubadora para mantener los cultivos a una temperatura de 26 ± 1 °C durante 7 días. Las membranas de KBC obtenidas se lavaron durante 30 minutos 3 veces en una solución de NaOH 1 M a 85 °C para eliminar células e impurezas. Luego del lavado se enjuagaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Finalmente, las membranas de KBC y KBC-cacao se filtraron por gravedad (Indriyati et al. 2019) y se secaron a temperatura ambiente durante 4 días. Estas membranas se prepararon por triplicado en las mismas condiciones, variando únicamente la concentración de sacarosa.

Determinación del espesor y peso de las membranas KBC y KBC-cacao.

Los espesores las membranas KBC se midieron utilizando un micrómetro electrónico Oumefar con un rango de 0-12 mm y resolución de 0,01 mm. Por otro lado, el peso de las membranas se determinó mediante una balanza digital marca Amir con una resolución de 0,001 g, en un rango de medición de 0,05 a 500 g.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la superficie de la membrana de KBC se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Vega TS-5136SB, Tescan, Kohoutovice, República Checa) que opera en modo de bajo vacío. Las muestras se montaron sobre una base de aluminio con cinta de carbón.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para la caracterización química y estructural de las muestras de celulosa bacteriana se utilizó un espectrómetro FTIR Bruker, modelo VERTEX 70 en un rango de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , en modo de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) y una resolución espectral de 4 cm^{-1} , con 120 escaneos por muestra. Se empleó el software Origin 6.0 para analizar los espectros de absorción.

Determinación de índices de cristalinidad en KBC y KBC-cacao

Los espectros FTIR de las membranas se normalizaron en 1027 cm^{-1} (vibración de extensión C-O), debido a que esta fue la banda de mayor intensidad en las muestras analizadas. Primeramente, el índice de orden lateral (LOI) se define como la relación entre las intensidades entre las bandas a 1427 y 895 cm^{-1} , $I(1427)/I(895)$ (Hurtubise y KrÄSSIG 1960; Nelson y O'Connor, 1964a); mientras que el índice total de cristalinidad (TCI), se define como la relación entre



las intensidades entre las bandas a 1371cm^{-1} y 2895cm^{-1} , $I(1371)/I(2895)$ (Kruer-Zerhusen *et al.* 2017; Nelson y O'Connor 1964a). La siguiente propiedad estructural es la intensidad de bandas de hidrógeno (HBI), calculada como $I(3340)/I(1337)$ (Nada *et al.* 2000) y finalmente, la fracción α de la celulosa ($f\alpha$) se determinó utilizando las áreas deconvolucionadas de las bandas a 750cm^{-1} y 710cm^{-1} respectivamente, de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Kataoka y Kondo 1999; Zeng *et al.* 2011a; Żywicka *et al.* 2018):

$$f_{\alpha} = 2.55 \times f_{\text{IR}} - 0.32 \quad (1)$$

donde

$$f_{\text{IR}} = \frac{A_{750}}{A_{750} + A_{710}} \quad (2)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espesor y peso de KBC y KBC-cacao

La figura 1(a) y 1(b) muestra el grosor y el peso respectivamente de las membranas de KBC (húmedas y secas) en función del contenido de sacarosa. En ambos casos se observa un aumento tanto del espesor como del peso de la membrana con el contenido de sacarosa. Esto se puede atribuir a una mayor producción de celulosa por los microorganismos de la cepa Kombucha causada por el aumento en la cantidad de fuente de carbono (Aswini *et al.* 2020; Kulkarni *et al.* 2012). En el caso de las membranas KBC cultivadas en el medio de cultivo adicionado con extracto de cacao, se observó un aumento de espesor superior al doble con respecto a la membrana crecida sin adicionar extracto de cacao. Esto podría deberse a los nutrientes y compuestos antioxidantes presentes en el extracto de cacao (Saavedra-Sanabria *et al.* 2021). Después del proceso de secado de las membranas KBC, el espesor en ambos tipos de membranas se redujo a valores entre $0,6-1,1 \pm 0,2$ mm. Por otra parte, tras el proceso de secado de las membranas, su peso se redujo al 10% de su peso húmedo.

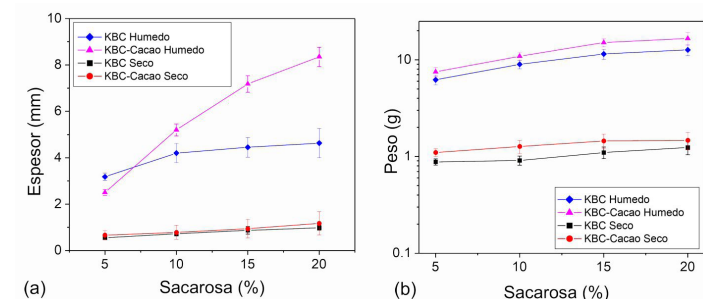


Figura 1. (a) Espesor vs concentración de sacarosa, (b) Peso vs concentración de sacarosa empleada en la síntesis de membranas de celulosa bacteriana Kombucha

Apariencia morfológica de KBC y KBC-cacao

La figura 2 muestra la morfología superficial de muestras de celulosa bacteriana preparadas en condiciones de cultivo

estático con 5 y 20 % de sacarosa (a, b) respectivamente, así como el crecimiento de celulosa bacteriana en el medio de cultivo adicionado con *Theobroma cacao*, con 5 y 20 % de sacarosa (c, d) respectivamente. Las micrografías obtenidas de KBC y KBC-cacao revelaron una red densamente empaquetada de fibras con diámetros entre $1,3$ y $3,8\ \mu\text{m}$. Estas observaciones concuerdan con la morfología típica de las microfibrillas preparadas en condiciones de cultivo estático, con un gran número de ellas conectadas por puentes de hidrógeno, formando una estructura de red densa durante su formación (Zhang *et al.* 2018). No se observan diferencias morfológicas aparentes con respecto a la variación en el contenido de sacarosa aplicado en el medio de cultivo para KBC Figuras 2(a), y 2(b) y, también para KBC-cacao Figuras 2(c) y 2(d) respectivamente, excepto por una apariencia morfológica más rugosa observada para las muestras de KBC-cacao con 20% de sacarosa en el medio de cultivo, en comparación con las muestras con 5% de sacarosa. Este aspecto rugoso de las muestras preparadas en condiciones de fermentación estática podría deberse al importante número de compuestos antioxidantes y nutrientes presentes en el té negro y en el cacao, ya que KBC como KBC-cacao se sintetizan cuando las moléculas de celulosa se excretan fuera de la superficie celular a través de los poros durante el crecimiento celular.

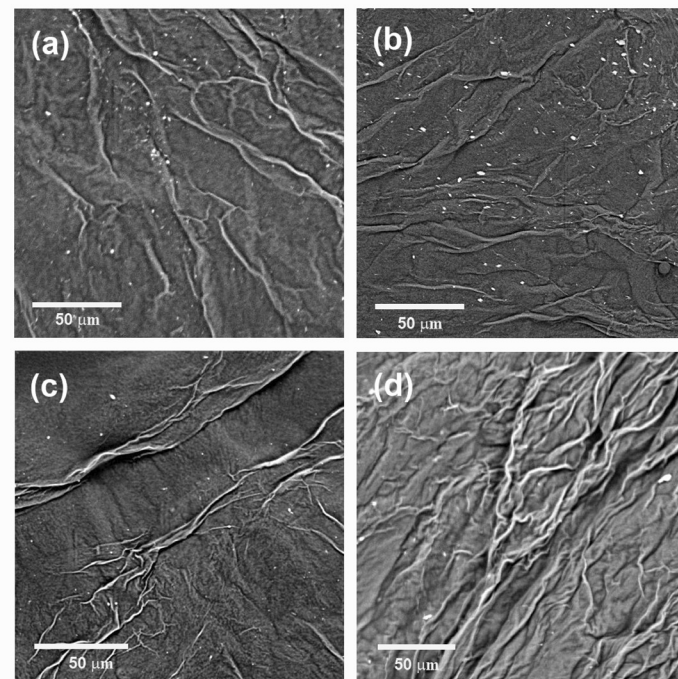


Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las membranas de celulosa bacteriana Kombucha sintetizadas con 5% (a) y 20% (b). Membranas de celulosa bacteriana Kombucha sintetizadas en el mismo medio de cultivo pero adicionado con cacao orgánico (*Theobroma cacao*) al 5% (c) y 20% (d).

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de KBC y KBC-cacao

Los espectros vibracionales de las membranas de KBC y KBC-cacao se obtuvieron mediante espectroscopia FTIR,

después de secadas las muestras. La figura 3 (a, b, c y d) muestra los espectros FTIR de muestras de KBC preparadas con 5, 10, 15 y 20 % de sacarosa, para ambos medios de cultivo, respectivamente.

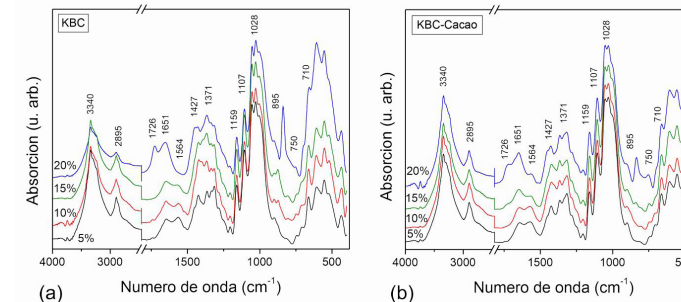


Figura 3. Espectros FTIR de (a) KBC, y (b) KBC-cacao. Ambos tipos de membranas fueron preparadas con 5, 10, 15, y 20% de sacarosa en el medio de cultivo.

Una banda ancha en 3340cm^{-1} se atribuye a los modos de vibración de extensión de los grupos O-H, mientras que la banda en 2895cm^{-1} surge de los modos vibracionales de extensión de los grupos C-H en la membrana de celulosa. La banda en 1726cm^{-1} se puede relacionar con los modos vibracionales de extensión del carbonilo perteneciente al grupo aldehído, que puede existir en forma hemiacetal, acetal y/o hidratos (Babac y Kutsal 2009). La banda en 1651cm^{-1} corresponde a las vibraciones de deformación de los grupos O-H de la molécula de agua. Asimismo, diferentes bandas de absorción en el intervalo espectral $1600-1200\text{cm}^{-1}$ son sensibles a transformaciones químicas y estructurales, como las observadas a 1564 , 1427 , 1371 , 1337 y 1313cm^{-1} cuya intensidad de algunas de ellas determina los índices de cristalinidad de las muestras de celulosa bacteriana (Atykyan *et al.* 2020; Kruer-Zerhusen *et al.* 2017). Además de lo anterior, las bandas de absorción en 1159 , 1107 y 1028cm^{-1} están asociadas a los modos vibracionales de extensión C-O/C-H de los azúcares en la celulosa y a los modos vibracionales de extensión C-O-C de enlaces glucosídicos β -(1, 4) entre los azúcares (Schwanninger *et al.* 2004). La banda de 895cm^{-1} también es característica del enlace glucosídico β -(1, 4) de la celulosa. Las bandas de absorción a 750 y 710cm^{-1} están asociadas a la celulosa triclinica ($I\alpha$) y monoclinica ($I\beta$) de la celulosa tipo I (Atykyan *et al.* 2020). Para el caso de las membranas de KBC-cacao se observaron bandas de absorción similares a las de KBC, aunque con diferentes intensidades de absorción entre ambos tipos de membranas.

El índice de orden lateral (LOI) es una propiedad asociada con la cantidad de estructura cristalina de la celulosa. Este se calculó utilizando la relación entre la intensidad de las bandas a 895cm^{-1} (enlace glucosídico β -(1, 4) en celulosa) y 1427cm^{-1} , (Nelson y O'Connor, 1964b). La Figura 4 muestra la variación LOI respecto a la concentración de sacarosa. Se observó un comportamiento exponencial con la concentración de sacarosa (5 a 20 %) añadida al medio de

cultivo para la obtención de celulosa bacteriana. El aumento de LOI se explica en términos de la cantidad de fuente de carbono que aumenta fuertemente por la sacarosa, lo que sugiere que la cristalización de la celulosa aumenta con la concentración de sacarosa. El LOI aumentó (17%) para el 15% de sacarosa, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el LOI para ambos tipos de membranas KCB y KCB-cacao para el resto de las concentraciones de sacarosa.

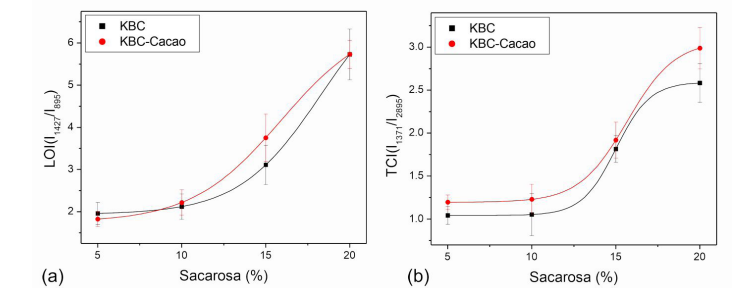


Figura 4. (a) Índice de orden lateral (LOI), y (b) índice de cristalinidad total (TCI) de celulosa bacteriana Kombucha y su dependencia con la concentración de sacarosa.

De manera similar el índice de cristalinidad total (TCI) se puede estimar con el espectro FTIR de la celulosa bacteriana de Kombucha como la relación de intensidades entre las bandas de 1371cm^{-1} y 2895cm^{-1} (Nelson y O'Connor 1964). La Figura 4(b) muestra el aumento de TCI con la concentración (5-20%) de sacarosa, lo que sugiere un aumento de la cristalinidad o grado de regularidad intermolecular. El TCI de la celulosa bacteriana Kombucha (KBC) preparada con *Theobroma cacao* fue ligeramente superior al de la KBC simple (13 %) para el 20 % de sacarosa. Esto podría deberse al contenido de vitaminas y ácido fólico en el extracto de cacao, que aceleran el metabolismo de los microorganismos productores de celulosa (Saavedra-Sanabria *et al.* 2021).

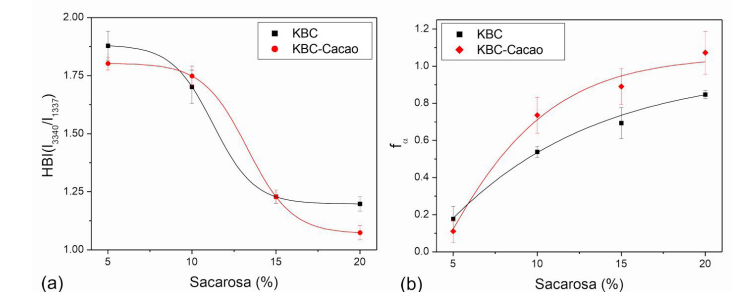


Figura 5. (a) Intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI), y (b) fracción α ($f\alpha$) de celulosa bacteriana Kombucha y su dependencia con la concentración de sacarosa.

Otro parámetro estructural importante es la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI), la cual se puede estimar como la relación de intensidades entre las bandas de 3340cm^{-1} y 1337cm^{-1} . La figura 5(a) muestra que el HBI disminuye con la concentración de sacarosa, lo que indica que la cristalización aumenta de forma inversa con la cantidad de agua unida (hidrógeno).

La adición de *Theobroma cacao* en los medios de cultivo disminuyó la magnitud de HBI (10%) con respecto a KBC simple para 20% de sacarosa. El HBI también se puede asociar con el grado de regularidad intermolecular en el sistema cristalino, en términos de la cantidad de enlaces de hidrógeno (Nada et al. 2000; Oh et al. 2005; Široký et al. 2009).

Finalmente, se estimó la fracción α a partir de la deconvolución lorentziana del espectro FTIR de la celulosa bacteriana *Kombucha* calculando el área de las bandas a 710 y 750 cm^{-1} respectivamente y, utilizando las ecuaciones 1 y 2. Esta propiedad estructural se puede relacionar con la formación de la celulosa tipo I (Kataoka y Kondo 1999). La figura 5(b) muestra el aumento de la fracción α con la concentración de sacarosa. La adición de *Theobroma cacao* en los medios de cultivo aumentó la magnitud de $f\alpha$ (21%) para una concentración de sacarosa de 20% sugiriendo el aumento de la cristalización debido a los compuestos presentes en el extracto de cacao. De esta manera, las propiedades cristalinas de las membranas de celulosa bacteriana *Kombucha*, sintetizadas por fermentación líquida en té negro y té negro adicionado con cacao, pueden ser controladas con la concentración de sacarosa y evaluadas mediante su espectro FTIR.

CONCLUSIONES

Se observó el aumento de la cristalinidad en membranas de celulosa bacteriana *Kombucha* sintetizadas por fermentación líquida en té negro y té negro adicionado con cacao, debido al aumento de la concentración de sacarosa. Se evaluaron varios parámetros estructurales como el índice de orden lateral (LOI), el índice total de cristalinidad (TCI), la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI), así como la fracción α ($f\alpha$), en función de la concentración de sacarosa. La obtención de celulosa tipo I así como el nivel de cristalización obtenido pueden ser controlados con el contenido de sacarosa agregada antes el proceso de fermentación y evaluada en las membranas mediante espectroscopia FTIR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), CIDS-ICUAP ECO-Campus Valsequillo; así como a la Secretaría de Investigación y Posgrado-IPN por el apoyo financiero. Asimismo, los autores agradecen a la Dra. M. Miranda por su contribución a esta investigación.

REFERENCIAS

Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., Virginia Partha Devanthi, P., & . K. (2020). Isolation and Screening of Microbial Isolates from *Kombucha* Culture for Bacterial Cellulose Production in Sugarcane Molasses Medium. *KnE Life Sciences*, 2020, 111–127. <https://doi.org/10.18502/kls.v5i2.6444>

Aswini, K., Gopal, N. O., & Uthandi, S. (2020). Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12896-020-00639-6/TABLES/4>

Atykhan, N., Revin, V., & Shutova, V. (2020). Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structure al differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media. *AMB Express*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13568-020-01020-8>

Babac, C., & Kutsal, T. (2009). Production and Characterization of Biodegradable Bacterial Cellulose Membranes. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3(2), 1–2.

Bardone, E., Marzocchella, A., Keshavarz, T., Vasconcellos, V. M., & Farinas, C. S. (2018). The Effect of the Drying Process on the Properties of Bacterial Cellulose Films from *Gluconacetobacter hansenii*. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 64. <https://doi.org/10.3303/CET1864025>

Domskiene, J., Sederavičiute, F., & Simonaityte, J. (2019). *Kombucha* bacterial cellulose for sustainable fashion. *International Journal of Clothing Science and Technology*, 31(5), 644–652. <https://doi.org/10.1108/IJCST-02-2019-0010>

Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>

Hurtubise, F. G., & KrÄSSIG, H. (1960). Classification of Fine Structural Characteristics in Cellulose by Infrared Spectroscopy Use of Potassium Bromide Pellet Technique. *Analytical Chemistry*, 32(2), 177–181. <https://doi.org/10.1021/ac60158a010>

Indriyati, Irmawati, Y., & Puspitasari, T. (2019). Comparative study of bacterial cellulose film dried using microwave and air convection heating. *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 51(1), 121–132.

<https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2019.51.1.8>

Jacek, P., Silva, F. A. G. S. da, Dourado, F., Bielecki, S., & Gama, M. (2021). Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100022. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2020.100022>

Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7120700>

Kataoka, Y., & Kondo, T. (1999). Quantitative analysis for the cellulose I α crystalline phase in developing wood cell walls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00065-8)

Kruer-Zerhusen, N., Cantero-Tubilla, B., & Wilson, D. B. (2017). Characterization of cellulose crystallinity after enzymatic treatment using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Cellulose* 2017 25:1, 25(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/S10570-017-1542-0>

Kulkarni, P. K., Anil Dixit, S., & Singh, U. B. (2012). Evaluation of bacterial cellulose produced from *Acetobacter xylinum* as pharmaceutical excipient. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 2(2), 72–86. <https://doi.org/10.3923/AJDD.2012.72.86>

Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. <http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tcyt>, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

Mukadam, T. A., Punjabi, K., Deshpande, S. D., Vaidya, S. P., & Chowdhary, A. S. (2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from *Kombucha* Tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 32–41. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.004>

Nada, A. A. M. A., Kamel, S., & El-Sakhawy, M. (2000). Thermal behaviour and infrared spectroscopy of cellulose carbamates. *Polymer Degradation and Stability*, 70(3), 347–355. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00119-1)

Nelson, M. L., & O'Connor, R. T. (1964a). Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Lattice Type . Part II . A New Infrared Ratio for Estimation of Crystallinity in Celluloses I and II *. *Journal of Applied Polymer Science*, 8, 1325–1341.

Nelson, M. L., & O'Connor, R. T. (1964b). Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 8(3), 1311–1324. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080322>

Oh, S. Y., Yoo, D. il, Shin, Y., & Seo, G. (2005). FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, 340(3), 417–428. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2004.11.027>

Popa, L., Ghica, M. V., Tudoroiu, E. E., Ionescu, D. G., & Dinu-Pirvu, C. E. (2022). Bacterial Cellulose—A Remarkable Polymer as a Source for Biomaterials Tailoring. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 1054, 15(3), 1054. <https://doi.org/10.3390/MA15031054>

Revin, V., Liyaskina, E., Nazarkina, M., Bogatyreva, A., & Shchankin, M. (2018). Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.12.012>

Ruka, D. R., Simon, G. P., & Dean, K. M. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 613–622. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.03.059>

Saavedra-Sanabria, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118645. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118645>

Schwanninger, M., Rodrigues, J. C., Pereira, H., & Hinterstoisser, B. (2004). Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy*, 36(1), 23–40. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2004.02.003>

Široký, J., Blackburn, R. S., Bechtold, T., Taylor, J., & White, P. (2009). Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide. *Cellulose* 2009 17:1, 17(1), 103–115. <https://doi.org/10.1007/S10570-009-9378-X>

Zeng, X., Liu, J., Chen, J., Wang, Q., Li, Z., & Wang, H. (2011a). Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1993–1999. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0989-5>

Zeng, X., Liu, J., Chen, J., Wang, Q., Li, Z., & Wang, H. (2011b). Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1993–1999. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0989-5>

Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., & Qiang, T. (2018). Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 705–713. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0303-7>

Zhu, C., Li, F., Zhou, X., Lin, L., & Zhang, T. (2014). *Kombucha*-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(5), 1548–1557. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34796>

Żywicka, A., Junka, A. F., Szymczyk, P., Chodaczek, G., Grzesiak, J., Sedghizadeh, P. P., & Fijałkowski, K. (2018). Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. *Carbohydrate Polymers*, 199, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.126>