



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Patricia Yissel Dávalos Cerrón
Tutora: Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

Ambato-Ecuador
Marzo 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 02 de Febrero del 2022

.....
Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía
C.I. 180414808-6
TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Patricia Yissel Dávalos Cerrón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

.....

Patricia Yissel Dávalos Cerrón

C.I. 175726044-1

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....
Presidente del Tribunal

.....
PhD. William Ricardo Calero Cáceres
C.I. 171434885-9

.....
Dr. Mario Daniel García Solís, PhD.
C.I.: 110360547-1

Ambato, 11 de Marzo del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

.....

Patricia Yissel Dávalos Cerrón

C.I. 175726044-1

AUTORA

DEDICATORIA

A los amores de mi vida, mis hijas Sofía e Isabel, por haber sido mi mayor inspiración en poner en marcha este largo camino con la certeza de poder ser un pequeño ejemplo que con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir todos los sueños y hacerlos realidad.

A mi querido esposo Guillermo, por su paciencia, amor y gran apoyo que día a día me ha sabido brindar para hacer realidad nuestras metas, compartiendo alegrías, tristezas, triunfos y sobretodo por ayudarme a enfrentar todas las dificultades que se han encontrado en el camino, pero que siempre hemos sabido salir adelante.

A mis padres, Rebeca y José Luis, por su amor incondicional y por haber sabido inculcarme valores como la humildad, paciencia, respeto y sobretodo muchas ganas de salir adelante sin importar ni el momento ni el lugar estando siempre a mi lado, aunque la distancia nos separe.

A mi hermana Vanessa, por escucharme siempre y repetirme cada día que soy su mayor ejemplo y su fuente de inspiración para vencer obstáculos y creer que todo es posible.

A mi abuelita Teresa, sin dudar si estoy aquí es gracias a ella, porque ha sabido cuidarme, educarme y sobretodo quererme en cada una de las etapas de mi vida.

A mi tía Matilde Luisa, aunque no esté físicamente conmigo siempre lo está en mis pensamientos y en mi corazón, has dejado una huella interior con tu ejemplo de superación enseñándome a ser una persona de bien con principios y valores que jamás podré olvidar.

Patricia Davalos

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por haberme apoyado incondicionalmente a pesar de la distancia para poder hacer realidad este sueño.

A mi tía Claudia, por su cariño, confianza y gran apoyo en estos años creyendo siempre en que podría lograrlo.

A mi madre, por todo su apoyo hacia mí y hacia mis hijas, nada hubiera sido posible sin ella en mi vida.

A mi tutora, Dra. Liliana Cerda, por su paciencia al compartir sus conocimientos y haber sido mi guía en este trabajo de titulación.

Al Dr. Mario García, por toda su enseñanza, su importante apoyo y aporte en este proyecto.

A mi querida amiga Adriana, por su inmensa paciencia y apoyo en estos años de carrera, gracias por todo el cariño y amistad brindada.

Patricia Davalos

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Biopolímeros.....	1
1.1.2. Tipos de biopolímeros por su origen.....	2
1.1.2.1. Biopolímeros naturales.....	2
1.1.2.2. Biopolímeros sintéticos	2
1.1.2.3. Clasificación de los biopolímeros según su degradabilidad.....	2
1.1.3. Celulosa.....	3
1.1.3.1. Vías de síntesis de la celulosa	4
1.1.4. Celulosa bacteriana	5
1.1.4.1. Estructura.....	6
1.1.4.2. Función fisiológica de la celulosa bacteriana	7
1.1.4.3. Biosíntesis.....	7
1.1.4.5. Técnicas de fermentación	9
1.1.5. <i>Komagataeibacter xylinus</i>	11

1.1.6.	Fuentes de carbono.....	12
1.1.6.1.	Glucosa	12
1.1.6.2.	Suero lácteo	12
1.1.6.3.	Etilenglicol	13
1.1.7.	Fuentes acéticas de aislamiento de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	13
1.1.7.1.	Vino	13
1.1.7.2.	Vinagre de vino	14
1.1.7.3.	Kombucha.....	14
1.1.8.	Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana	16
1.2.	Objetivos.....	18
1.2.1.	Objetivo general	18
1.2.2.	Objetivos específicos	18
CAPÍTULO II		19
METODOLOGÍA		19
2.1.	Materiales	19
2.1.1.	Materiales de laboratorio	19
2.1.2.	Reactivos.....	19
2.1.3.	Equipos	20
2.1.4.	Recursos tecnológicos.....	20
2.2.	Métodos	21
2.2.1.	Medios de cultivo para el aislamiento de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	21
2.2.1.1.	Medio H-S.....	21
2.2.1.2.	Medio GYC.....	21
2.2.1.3.	Medio H-S – Etilenglicol/suero de leche fermentado.....	22
2.2.1.4.	Medio K-suero de leche fermentado/etilenglicol.....	22

2.2.2. Obtención del suero de leche fermentado.....	23
2.2.3. Obtención de biofilms a partir de la cepa comercial <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004.....	23
2.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas productoras de CB a partir de vino, vinagre de vino, té de kombucha y SCOBY de kombucha	24
2.2.5. Selección de cepas bacterianas productoras de CB a partir de vino, vinagre de vino, té de kombucha y SCOBY de kombucha	25
2.2.6. Obtención de los biofilms en medios líquidos.....	25
2.2.7. Conservación de las cepas productoras de CB	26
2.2.8. Recuperación de la CB	26
2.2.9. Identificación morfológica de las cepas aisladas.....	26
2.2.10. Extracción del ADN genómico.....	27
1.2.11. Identificación molecular de las bacterias aisladas.....	28
CAPÍTULO III.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
3.1. Análisis y discusión de los resultados	29
3.1.1. Producción de biofilms con la cepa comercial <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004	29
3.1.2. Aislamiento de cepas nativas de <i>Komagataeibacter xylinus</i> a partir de fuentes acéticas.....	31
3.1.3. Obtención de biofilms a partir de las cepas aisladas de vino y vinagre de vino	32
3.1.4. Aislamiento de cepas nativas de <i>Komagataeibacter xylinus</i> de SCOBY de kombucha.....	34
3.1.5. Obtención de biofilms a partir de las cepas aisladas del SCOBY de kombucha	37

3.1.6. Comparación de la producción de CB entre <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 y las cepas aisladas	38
3.1.7. Obtención de los pesos de celulosa bacteriana y comparación entre las cepas aisladas.....	42
3.1.8. Identificación morfológica de las cepas aisladas.....	44
3.1.8. Identificación molecular de las cepas aisladas	45
CAPÍTULO IV.....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
4.1. Conclusiones.....	50
4.2. Recomendaciones.....	51
MATERIALES DE REFERENCIA	52
Referencias bibliográficas	52
ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de biopolímeros según su degradabilidad.....	3
Tabla 2. Taxonomía de <i>K. xylinus</i>	11
Tabla 3. Ejemplos de algunas aplicaciones comerciales de la CB.....	17
Tabla 4. Componentes del medio de cultivo H-S	21
Tabla 5. Componentes del medio de cultivo GYC	22
Tabla 6. Componentes de los medios de cultivo H-S modificados.....	22
Tabla 7. Componentes de los medios de cultivo K-suero de leche/etilenglicol.....	23
Tabla 8. Comparación de formación de CB entre las cepas aisladas y DSM2004	39
Tabla 9. Comparación de los pesos en húmedo de CB entre las diferentes cepas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la celulosa	4
Figura 2. Principales vías para la formación de celulosa.....	5

Figura 3. Estructura química de la CB.....	6
Figura 4. Tipos de celulosa I presentes en la CB.....	7
Figura 5. Esquema de la formación de CB del microorganismo <i>Acetobacter xylinum</i>	8
Figura 6. Biosíntesis de CB.....	9
Figura 7. Interacción microbiana en la fermentación del té de kombucha	15
Figura 8. Formación de CB por <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM2004. A: 3 días de incubación; B: 15 días de incubación.....	29
Figura 9. Aislamiento de cepas de <i>Komagataeibacter xylinus</i> a partir de muestras de A: vinagre (medio GYC); B: vino (medio H-S); C: Ejemplo de una cepa aislada de vino ..	31
Figura 10. Prueba preliminar de formación de CB por las cepas PDC 1- PDC 10 en medio H-S estándar	33
Figura 11. Formación de biofilms a partir de un inóculo de SCOBY de kombucha en medios A: H-S; B: H-S suero de leche fermentado; C: H-S etilenglicol	35
Figura 12. A: Aislamiento de cepas productoras de CB a partir de SCOBY de kombucha; B: Estriado compuesto de una colonia seleccionada.....	36
Figura 13. Formación de CB por las cepas PDC 21 y PDC 25 en medio H-S estándar .	37
Figura 14. Tinción Gram de cepas A: PDC 21; B: PDC 25 (100 X)	45
Figura 15. A: Producto amplificado de la cepa PDC 21 de aproximadamente 1200 pb visualizado en gel de agarosa 1% M: Marcador de peso molecular; B: Producto amplificado de la cepa PDC 25	46
Figura 16. Cromatograma de secuencia cruda de aproximadamente 1400 pb obtenido con el Primer 1492R de la cepa PDC 21 visualizado en MEGA X	47
Figura 17. Cromatograma de secuencia cruda de aproximadamente 590 pb obtenido con el primer 27F de la cepa PDC 21 visualizado en MEGA X.....	48
Figura 18. Secuencia parcial de 1029 pb obtenida de la secuencia cruda del Primer 1492R de la cepa PDC 21	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de cepas nativas de <i>K. xylinus</i> a partir de vino y vinagre de vino en medios H-S y GYC agar	63
---	----

Anexo 2. Aislamiento de cepas de las muestras de vino y vinagre de vino en medio HS agar.....	64
Anexo 3. Pruebas de producción de CB en medio H-S con cepas aisladas de vino y vinagre.....	64
Anexo 4 Aislamiento de cepas nativas de <i>K. xylinus</i> a partir de SCOBY de kombucha.	65
Anexo 5. Pruebas de producción de CB en medio H-S con las cepas aisladas de SCOBY de kombucha	66
Anexo 6. Obtención de biofilms de las cepas PDC 21, PDC 25 y DSM 2004 en los diferentes medios de cultivo.....	67
Anexo 7. Cuantificación de ADN genómico de la cepa PDC 21	68
Anexo 8. Cuantificación de ADN genómico de la cepa PDC 25	68

RESUMEN

Komagataeibacter xylinus es la especie más eficiente, capaz de sintetizar biofilms de celulosa bacteriana (CB) a partir de una amplia variedad de fuentes de carbono. Este biopolímero ha recibido una atención considerable en los últimos años por sus diversas aplicaciones comerciales, especialmente en la industria alimentaria y biomédica debido a su alta pureza y variedad de formas y texturas.

En el presente estudio se aisló y caracterizó cepas nativas de *K. xylinus* a partir de fuentes acéticas como el vino, vinagre de vino y SCOBY de kombucha en los medios H-S y GYC comparando su producción con la cepa de control *K. xylinus* DSM 2004 en las diferentes fuentes de carbono (glucosa, suero de leche y etilenglicol) en cultivo estático.

Se aislaron dos cepas a partir del SCOBY de kombucha. Los resultados revelaron que ambas cepas denominadas PDC 21 y PDC 25, y la cepa de control sintetizaron CB en diferentes cantidades a partir de glucosa, etilenglicol y suero de leche fermentado. La cepa PDC 25 produjo casi 8 veces más CB que la cepa control en el medio H-S estándar en comparación con PDC 21 que solo sintetizó 0.4 veces de CB húmeda, mientras que con etilenglicol PDC 25 sintetizó 1.4 y 3.46 veces más CB en los medios H-S etilenglicol y K-etilenglicol respectivamente en comparación con la cepa de control. Sin embargo, *K. xylinus* DSM 2004 produjo cantidades mayores de CB en los medios que contenían suero de leche fermentado.

Palabras clave: Celulosa bacteriana (CB), *Komagataeibacter xylinus*, biopolímeros, PDC 21, PDC 25, glucosa, suero de leche, etilenglicol.

ABSTRACT

Komagataeibacter xylinus is the most efficient species, being able to synthesize bacterial cellulose biofilms (CB) from a great variety of carbon sources. This biopolymer has received considerable attention on the last few years due to diverse commercial applications, especially in the food industry and biomedical due to its high purity and variety in form and texture.

In the present study, native strains of *K. xylinus* were isolated and characterized from acetic sources such as wine, wine vinegar and kombucha SCOBY in the media H-S and GYC comparing its production with the strain from control *K. xylinus* DSM 2004 in the different carbon sources (glucose, whey and ethylene glycol) in static cultivation.

Two strains were isolated from the kombucha SCOBY. The results revealed that both strains denominated PDC 21 and PDC 25, and the control strain synthesized CB in different amounts from the glucose, ethylene glycol and fermented milk serum. The strain PDC 25 produced almost 8 more times CB than the strain control in the standard H-S medium compared with PDC 21 that only synthesized 0.4 times the CB humid, meanwhile with ethylene glycol PDC 25 synthesized 1.4 and 3.46 more times CB in the media H-S ethylene glycol and K- ethylene glycol respectively compared by the control strain. However, *K. xylinus* DSM 2004 produced larger amounts of CB in the media that contained fermented milk serum.

Keywords: bacterial cellulose (CB), *Komagataeibacter xylinus*, biopolymers, PDC 21, PDC 25, glucose, milk serum, ethylene glycol

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Biopolímeros

Los biopolímeros, son polímeros producidos a partir de fuentes naturales, los cuales pueden ser sintetizados químicamente a partir de materiales biológicos como azúcares, aminoácidos, aceites y grasas o biosintetizados completamente por organismos vivos como animales, plantas, bacterias y hongos durante su crecimiento **(Smith et al., 2016)**. Son compuestos químicos biodegradables y es considerado el compuesto más orgánico de la ecosfera, siendo algunos ejemplos las proteínas, los carbohidratos, los lípidos, los ácidos nucleicos, los péptidos y los polisacáridos (como el almidón, glucógeno y la celulosa) **(Wankhade, 2020)**.

Su importancia en la investigación en los últimos años radica en su abundancia, biocompatibilidad y propiedades únicas de biodegradabilidad y no toxicidad potenciando sus aplicaciones en electrónica, dispositivos médicos, energía, envasado de alimentos, sensores de gases y vapores, etc. **(Krebsz et al., 2017)**. Además, el costo relativamente bajo y la naturaleza renovable hacen que esta clase de material sea adecuado para el desarrollo de biofiltros y barreras para el tratamiento y uso de efluentes a gran escala, convirtiéndose en una alternativa a los polímeros sintéticos debido a sus enormes beneficios ambientales **(Ashraf et al., 2016)**.

A pesar de que se ha determinado que los biopolímeros representan solo un porcentaje reducido del mercado de polímeros, se ha identificado que poseen la capacidad de reemplazar del 30 al 90% de los polímeros fabricados a base de petróleo **(Shen et al., 2009)**.

1.1.2. Tipos de biopolímeros por su origen

1.1.2.1. Biopolímeros naturales

Son aquellos materiales que son sintetizados de forma natural por animales, plantas, bacterias y hongos, estos se clasifican en proteínas (elastina, colágeno, etc.), poliésteres (ácido poliláctico y polihidroxicanoatos), polisacáridos (quitina, celulosa, almidón, pectina, hemicelulosa, ácido hialurónico), polifenoles (tanino, lignina, ácido húmico), y otros (**Wankhade, 2020**).

1.1.2.2. Biopolímeros sintéticos

Son sintetizados a partir de materiales de origen biológico renovables y son biodegradables, su síntesis puede ocurrir de forma natural o mediante un proceso de síntesis química clásica, en la cual las moléculas sufren una degradación completa o parcial sin dejar residuos tóxicos dentro del cuerpo o en el medio ambiente, a diferencia de los polímeros sintéticos que son sintetizados a partir de recursos derivados del petróleo y su eliminación es problemática debido a sus propiedades acumulativas (**Kubicek, 2015**).

Los biopolímeros sintéticos han encontrado su mayor aplicabilidad en la medicina gracias a sus propiedades únicas de no inmunogenicidad, estabilidad, liberación controlada y eliminación del cuerpo. Son ejemplos de biopolímeros sintéticos: policaprolactona, alcohol de polivinilo, etc. (**Singh et al., 2021**).

1.1.2.3. Clasificación de los biopolímeros según su degradabilidad

Según **Ibrahim et al., (2019)** los biopolímeros pueden ser principalmente clasificados en biodegradables y no biodegradables, y a su vez pueden ser de base biológica y basado en fósiles. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de biopolímeros según su degradabilidad

Biodegradable			No biodegradable	
De base biológica			Basado en fósiles	De base biológica
Plantas	Microorganismo	Animales		
Celulosa y sus derivados	PHA (polihidroxialcanoato)	Quitina	PBA (poliadipato de butileno), PBS (polisuccinato de butileno)	PE (polietileno), PP (polipropileno)
Lignina	PHF (ácido graso polihidroxilado)	Quitosano	PGA (poliácido glicólico)	PET (politereftalato de etileno), PTT (politereftalato de trimetileno)
Almidón y sus derivados	Celulosa bacteriana	Hialuronano	PCL (policaprolactona)	PU (poliuretano)
Lípidos (triglicéridos)	Xantano	Suero (proteína)	POE (poliortoéster)	PC (policarbonato)
Carragenina	Seda (proteína)	Queratina		Poliésteres insaturados

Fuente: Tomado de **Ibrahim et al., (2019)**.

1.1.3. Celulosa

Es un polisacárido de estructura lineal, compuesto por unidades repetidas de β -D-glucopiranosas unidas covalentemente a través de funciones acetales entre el grupo OH (Figura 1) (**Klemm et al., 2005**). Su alta degradabilidad, resistencia al hidrólisis y a la tracción son sus principales propiedades, encontrando de esta forma diferentes aplicaciones en las industrias, proponiendo una solución a los problemas

medioambientales. Por ejemplo, las industrias de alimentos, madera, papel, textil, cosmética y farmacéutica (Ibrahim et al., 2019).

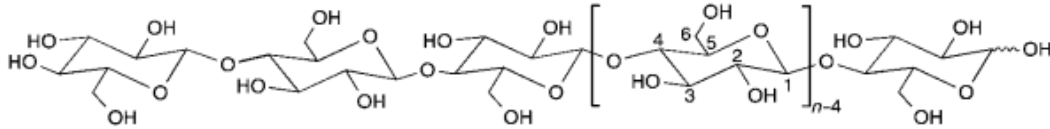


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa

Fuente: Klemm et al., (2005).

Es considerado el biopolímero más abundante del planeta con toneladas de producción anual de aproximadamente 1.5×10^{12} total de biomasa, convirtiéndose en una fuente casi inagotable de materia prima para la creciente demanda de productos biocompatibles (Klemm et al., 2005). La celulosa es obtenida generalmente de las plantas; sin embargo, también puede producirse in vitro a través de las vías enzimáticas, síntesis química y biosíntesis a partir de microorganismos (Ullah et al., 2016).

1.1.3.1. Vías de síntesis de la celulosa

Según Klemm et al., (2005), existen cuatro vías principales para la producción de celulosa (Figura 2). La vía dominante es a partir de plantas, en las cuales se puede encontrar en forma casi pura como por ejemplo en los pelos de las semillas del algodón, o aislarla mediante procesos químicos de pulpa, separación y purificación como es el caso de la celulosa proveniente de la madera. Además, la celulosa puede ser producida por ciertas bacterias, algas y hongos, siendo aprovechada para el desarrollo de nuevos biomateriales en futuras investigaciones.

Por otro lado, en los últimos años se ha logrado sintetizar celulosa in vitro, siendo la primera formación de celulosa catalizada por la enzima celulasa basada en fluoruro de celobiosilo (Kobayashi et al., 1991), mientras que la primera quimiosíntesis fue llevada

a cabo mediante una polimerización por apertura de anillo de restos de pivalato de D-glucosa sustituidos, seguida de desprotección (Nakatsubo et al., 1996).

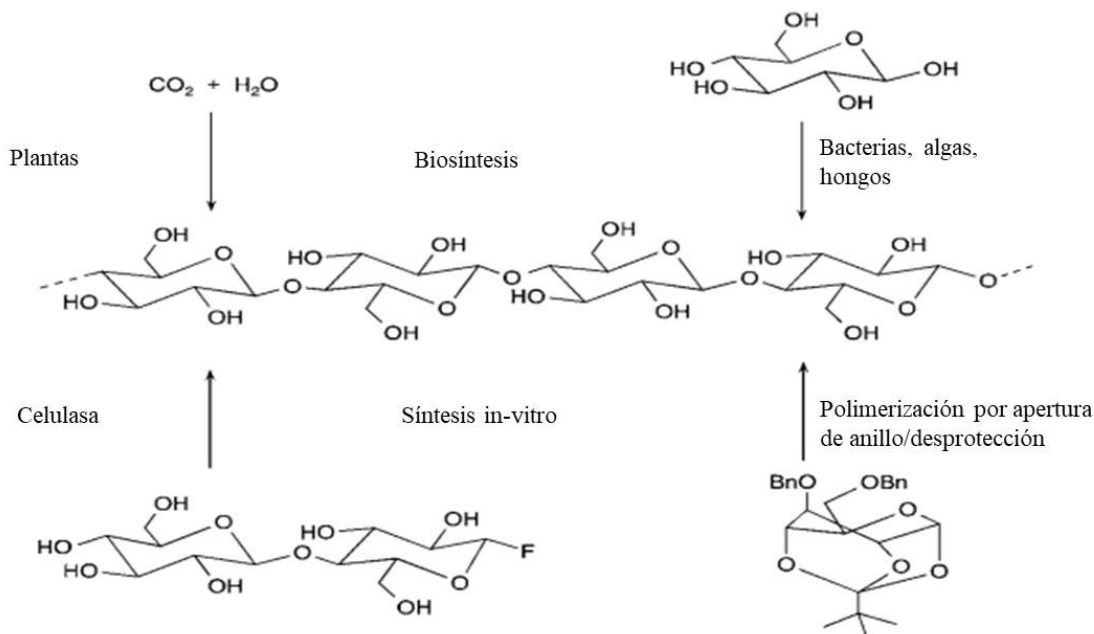


Figura 2. Principales vías para la formación de celulosa

Fuente: Modificado de Klemm et al., (2005).

1.1.4. Celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es un biopolímero extracelular producido por bacterias pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, etc., siendo la especie *Komagataeibacter xylinus* perteneciente a la familia de las acetobacterias la que produce niveles relativamente altos de CB de elevado nivel de pureza, matriz nano fibrilar y cristalinidad mucho más alta que la celulosa vegetal a partir de una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, convirtiéndose en un modelo ideal para estudios de producción de este biopolímero (Islam et al., 2017).

Se diferencia de la celulosa vegetal por no contener impurezas asociadas con las plantas como hemicelulosa, pectina y lignina (Gullo et al., 2019). Además, posee diversas propiedades estructurales, bioquímicas y mecánicas tales como bioadaptabilidad,

biodegradabilidad, bioconsistencia, estabilidad química, excelente capacidad para absorber agua (aproximadamente 200 veces su peso) debido a su estructura reticulada, alta resistencia a la tracción, alta resistencia en húmedo, entre otras (**Amin et al., 2012**).

1.1.4.1. Estructura

La estructura primaria de la CB consiste en una cadena de β -1-4-glucano, con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Figura 3), la cual experimenta eventos de agregación para formar una estructura en forma de cinta y posteriormente formar la estructura secundaria que genera la red 3D bien estructurada, característica de la CB (**Koyama et al., 1997**). La estructura terciaria, como resultado de los enlaces de hidrógeno intermoleculares y fuerzas de van der Waals, estabiliza toda la estructura a través de una red de enlaces de hidrógeno intramolecular por hidroxilos y oxígeno del anillo entre los residuos de glucosa (**Fontana et al., 2017**). Además, la formación de puentes de hidrógeno influye en las propiedades físicas y mecánicas de la celulosa otorgándole solubilidad, cristalinidad y contribuyen a la energía de deformación (20%) (**Tashiro & Kobayashi, 1991**).

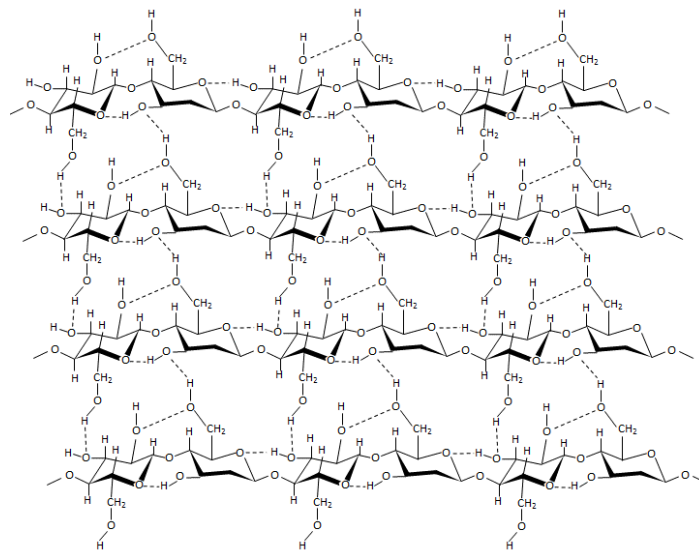


Figura 3. Estructura química de la CB

Fuente: Tomada de **Lustri et al., (2015)**.

La CB se diferencia de la vegetal por el contenido de celulosa I_α y I_β , los cuales difieren por el sistema cristalino, siendo el I_α la celulosa predominante en la CB con un rango de

60 a 80%, el cual se caracteriza por ser una fase metaestable de celulosa I (forma paralela de celulosa) con una celda unitaria triclinica, mientras que la celulosa I_{β} es una fase estable de celulosa con una celda unitaria monoclinica de dos cadenas (Figura 4), por lo cual la CB es menos estable termodinamicamente que otros tipos de celulosa que tienen un mayor porcentaje de celulosa I_{β} (Nishiyama et al., 2003). Sin embargo, la relación entre estas dos formas cristalinas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo (Carreño et al., 2012).

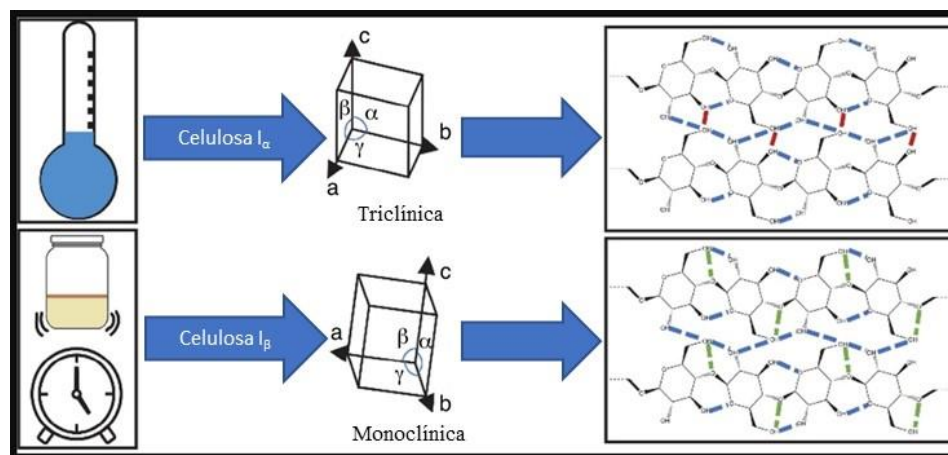


Figura 4. Tipos de celulosa I presentes en la CB

Fuente: Modificado de Van Zyl & Coburn, (2019).

1.1.4.2. Función fisiológica de la celulosa bacteriana

Según Hestrin & Schramm, (1954), las bacterias aerobias estrictas producen celulosa principalmente para mantenerse lo más cercana a la superficie de la solución (fase gaseosa), otros consideran que la producen para facilitar las interacciones simbióticas a través de la adhesión celular, protegiéndose contra enemigos o iones de metales pesados, y además otorga a su hábitat natural protección química, mecánica y biológica (Ross et al., 1991).

1.1.4.3. Biosíntesis

La producción de celulosa está regulada por el suministro de oxígeno y es independiente de la concentración de la fuente de carbono (**Budhiono et al., 1999**). La fuente de carbono es típicamente la glucosa, pero también pueden ser otras fuentes como manitol, melaza o jugo de frutas (**Ross et al., 1991**).

La síntesis de celulosa ocurre en el interior de la bacteria y se extruye como microfibras en forma de cinta entre las membranas externa y citoplasmática a una velocidad de 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Carreño et al., 2012**). Estas bacterias poseen poros de 3.5 nm, los cuales se encuentran alineados diametralmente en la membrana celular donde se encuentra el complejo enzimático celulosa-sintasa, rodeando cada uno de los poros por donde es excretada la CB en forma de subfibrillas. Estas subfibrillas de 1.5 nm de ancho, a su vez permiten el autoensamblaje de haces de microfibrillas por parte de las bacterias, las cuales posteriormente producen las fibras y el empaquetamiento de celulosa (Figura 5) (**Tokoh et al., 1998**).

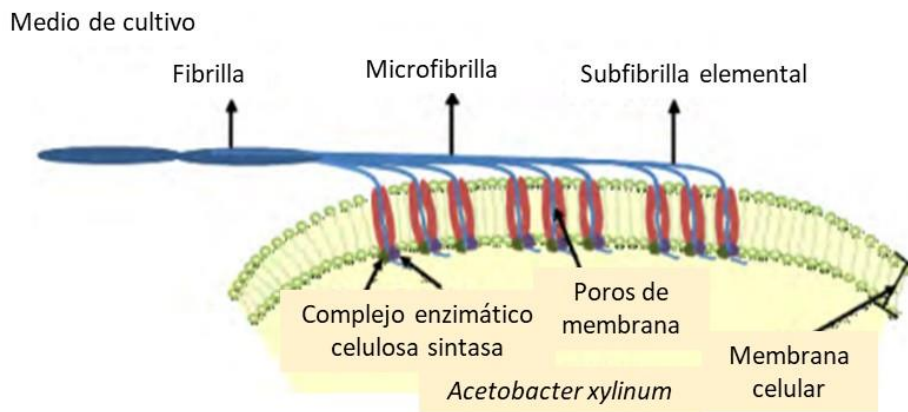


Figura 5. Esquema de la formación de CB del microorganismo *Acetobacter xylinum*

Fuente: Modificado de **Jonas & Farah, (1998)**.

Existen cuatro pasos enzimáticos clave en la síntesis de la CB, los cuales están divididos en dos etapas principales: la primera es la conversión de la fuente de carbono y la segunda la formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo (**Carreño et al., 2012**). En la Figura 6 se muestra como en primer lugar, la glucosa es convertida a glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) por acción de la enzima glucoquinasa, luego la Glc-6-P se isomeriza a glucosa-

1-fosfato (Glc-1-P) por acción de la fosfoglucomutasa, posteriormente la Glc-1-P se convierte en uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa, la cual finalmente puede ser utilizada por la celulosa sintasa para la síntesis de celulosa (Lee et al., 2014). La celulosa sintasa requiere de un complejo proteico esencial para la síntesis de celulosa, formado por dos subunidades principales derivadas de bacterias: BcsA la cual es una proteína interna y BcsB que es una proteína periplásmica que está anclada a la pared interna (Morgan et al., 2013).

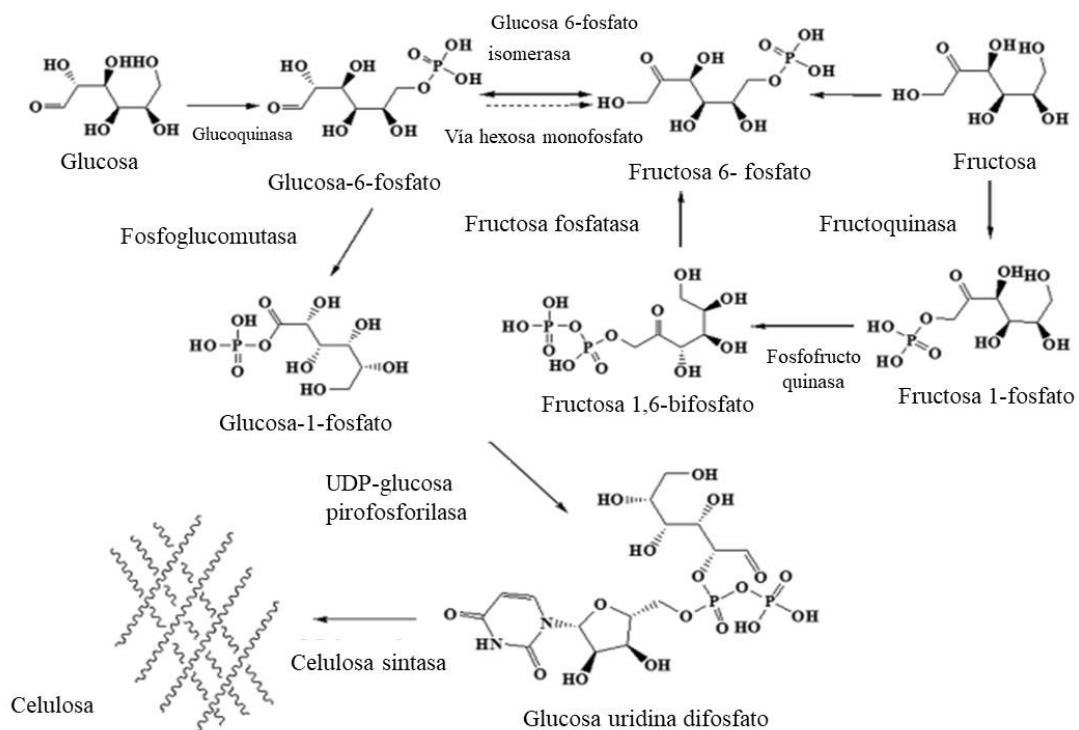


Figura 6. Biosíntesis de CB

Fuente: Modificado de Lin et al., (2013).

1.1.4.5. Técnicas de fermentación

1.1.4.5.1. Cultivo estático

En condiciones de cultivo estático, las bacterias forman películas planas de celulosa (aproximadamente el 1% del peso total) en forma de gel en la interfaz aire – líquido del

sistema de cultivo, lo cual permite acondicionar una serie de factores de forma que permitan la exposición al oxígeno, tales como tubos, frascos o bandejas poco profundas, siendo la formación de CB proporcional a la superficie del recipiente que la contiene (Isobe et al., 2018).

Este método consiste en inocular la bacteria y dejarla en reposo hasta evidenciar la formación de una capa gelatinosa, que posteriormente dará lugar a la formación de capas superpuestas, incrementándose así el espesor de la biopelícula a medida que transcurre el tiempo de fermentación (Van Zyl & Coburn, 2019).

Sin embargo, a pesar de ser uno de los métodos más empleados presenta inconvenientes como el requerimiento de tiempos largos y grandes áreas superficiales, lo cual dificulta su producción a escala industrial (Carreño et al., 2012).

1.1.4.5.2. Cultivo agitado

La producción de celulosa en un cultivo agitado, genera formas de celulosa agregadas irregularmente que varían según la cepa bacteriana, tipo de reactor y condiciones de operación aplicadas (Singhsa et al., 2018). A pesar de que en el cultivo agitado existe un incremento en la dispersión del material sólido debido al aumento de la tensión de cizallamiento, lo cual favorece tanto el crecimiento de las bacterias como las tasas de síntesis de celulosa (Toyosaki et al., 1995), este tipo de cultivo puede ocasionar mutaciones en ciertas cepas que conducen a cultivos incapaces de producir CB debido a que la agitación lesiona la maquinaria enzimática y favorece el crecimiento de células no formadoras del biopolímero, afectando de esta forma su productividad y escalamiento industrial (Carreño et al., 2012).

Tanskul et al., (2013), identificó que el cultivo agitado interfiere con el proceso de cristalización de la CB induciendo la formación de celulosa I_{β} , es decir que se produce una celulosa termodinámicamente más estable.

1.1.5. *Komagataeibacter xylinus*

Komagataeibacter xylinus, anteriormente llamada *Bacterium xylinum*, *Acetobacter xylinum* y *Gluconacetobacter xylinus* (Tabla 2), es un miembro de las bacterias del ácido acético (BAA), aerobio estricto en forma de bastón, no patógena, Gram negativo y catalasa positivo, el cual se encuentra normalmente en vinagres, vinos, té de kombucha, frutas y verduras, siendo capaz de producir celulosa al absorber azúcares como glucosa y fructosa (Lavasani et al., 2017). Estas bacterias forman CB de espesor variable que ayuda a las bacterias colonizadas a mantener un alto contenido de oxígeno cerca de la superficie, y son capaces de oxidar el acetato y el lactato en agua y CO₂ (Klemm et al., 2005).

Esta especie fue descrita por primera vez por Adrian John Brown en 1886 (Van Zyl & Coburn, 2019) y en el 2012, Yamada et al., (2012), la establecieron en el género G^o *Komagataeibacter*, el cual además hace referencia al microbiólogo de la Universidad de Tokio, el Dr. Komagata, quien aportó a la clasificación de estas especies acéticas. Esta nueva especie se caracteriza por sus colonias de color crema suave, capaz de crecer en el medio Hestrin-Scharmm (HS), con tamaños de 0.5 – 0.8 x 1.0 – 3.0 µm.

Tabla 2. Taxonomía de *K. xylinus*

Clasificación científica	
Reino	Monera
Filo	<i>Proteobacterias</i>
Clase	<i>Alfaproteobacterias</i>
Orden	<i>Rhodospirillales</i>
Familia	<i>Acetobacteraceae</i>
Género	<i>Komagataeibacter</i>
Especies	<i>Komagataeibacter xylinus</i>

Fuente: Yamada et al., (2012).

1.1.6. Fuentes de carbono

1.1.6.1. Glucosa

La glucosa es el monosacárido más empleado como fuente de energía en la formulación de los diferentes medios de cultivo y es considerada la fuente carbono por excelencia para el crecimiento y aislamiento del género *Komagataeibacter* (Van Zyl & Coburn, 2019). Se metaboliza a través del ciclo de pentosa-fosfato o el ciclo de Krebs, dependiendo del estado fisiológico del cultivo, en el caso del *K. xylinus* en la ruta convencional, es aprovechada para la formación final de CB gracias a la acción de la enzima principal celulosa sintasa (Gullo et al., 2017).

1.1.6.2. Suero lácteo

Es un subproducto de la industria láctea, el cual se genera posterior a la precipitación de la caseína a un pH de 4.5 y es considerado una rica fuente de nutrientes. Está compuesto principalmente por lactosa (4.5 a 5.0% p/v), proteínas solubles (0.6 a 0.8% p/v), lípidos (0.4 a 0.5% p/v) y sales minerales (8 a 10% p/v) (Kaur et al., 2020). Además, contiene otros ingredientes como ácido láctico, ácido cítrico, compuestos nitrogenados no proteicos y grupo de vitamina B (Raiszadeh et al., 2020).

El suero es producido en enormes cantidades en todo el mundo y si no es tratado, representa una gran amenaza para el medio ambiente, debido a que posee altos valores de DBO (40 – 60) y DQO (50 – 80) por las altas concentraciones de lactosa, proteínas y sales minerales (Alvarez et al., 2011).

La mayoría de las industrias lácteas no cuenta con la tecnología adecuada para su manejo sustentable; sin embargo, al ser rico en nutrientes, hoy en día el suero presenta importantes oportunidades en aplicaciones alimentarias y no alimentarias (Kaur et al., 2020), siendo además empleado como sustrato para el crecimiento de microorganismos en diferentes

procesos de fermentación y la posterior producción de diferentes productos como polímeros, geles y películas comestibles (**Jelen, 2011**).

1.1.6.3. Etilenglicol

El etilenglicol es un alcohol que tiene una estructura similar al glicerol. El glicerol es un triol C3 y el etilenglicol también es un poliol, pero un diol C2; sin embargo, a pesar de poseer dos grupos de alcoholes, no es empleado como combustible (**Minteer, 2011**). Se produce generalmente mediante la oxidación del recurso de origen petroquímico, el etileno, y también se puede producir a partir de una ruta sostenible que emplea un recurso biológico renovable llamado glicerol; un residuo de la industria del biodiesel (**Kandasamy et al., 2019**) y además, se puede biodegradar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el agua y el suelo (**Roy, 2016**).

A pesar de ser considerado tóxico, es muy usado debido a su baja volatilidad, densidad de energía bastante alta y alto punto de ebullición en comparación con otros combustibles orgánicos (**Ogumi & Miyazaki, 2009**).

1.1.7. Fuentes acéticas de aislamiento de *Komagataeibacter xylinus*

1.1.7.1. Vino

Es una bebida alcohólica elaborada generalmente a partir de uvas fermentadas, donde se lleva a cabo dos procesos fundamentales: la fermentación alcohólica, llevada a cabo por las levaduras que consumen el azúcar de las uvas y las convierten en etanol y dióxido de carbono y la fermentación maloláctica (**Joyeux et al., 1984**).

Las bacterias acéticas son capaces de transformar el etanol en ácido acético, alterando las propiedades organolépticas del vino mediante el incremento de la acidez volátil (>0.9 g/L de ácido acético), siendo consideradas bacterias indeseadas (**Pérez et al., 2014**); sin embargo, su presencia en el vino es casi inevitable ya que son capaces de sobrevivir a

ambientes anaerobios o semianaerobios, siendo necesario el empleo de agentes antimicrobianos como el anhídrido sulfuroso y temperaturas de conservación cercana a 10°C en la cual las bacterias acéticas son menos activas (**Kadere et al., 2008**).

1.1.7.2. Vinagre de vino

El vinagre es un producto ácido que surge a partir de la oxidación de sustratos que contienen etanol (**Gomes et al., 2018**). El proceso de obtención del vinagre comprende la fermentación de dos etapas: la conversión anaeróbica de azúcares a etanol llevada a cabo por las levaduras, seguido de la oxidación aeróbica del etanol a ácido acético, realizado por las bacterias del ácido acético (**Yetiman & Kesmen, 2015**).

Los sustratos generalmente empleados para la producción de vinagre suelen ser vino, sidra o sustratos alcohólicos derivados de la fermentación de frutas, etc. (**Yetiman & Kesmen, 2015**).

La microflora prevalente en los vinagres depende del porcentaje de acidez presente (**Gomes et al., 2018**). En estudios llevados a cabo por **Gullo et al., (2006)** se han encontrado especies del género *Gluconobacter* en vinagres con alta acidez (>0.6 % p/v de ácido acético), mientras que en vinagres con baja acidez se han hallado especies de *Acetobacter*.

1.1.7.3. Kombucha

El té de kombucha es una bebida probiótica originaria del noreste de China, Manchuria (**Chakravorty et al., 2016**) elaborada a partir de la fermentación del té negro o verde azucarado con un cultivo simbiótico de organismos fúngicos y bacterianos, también conocido como SCOBY, el cual es reconocido como una red de celulosa flotante que contiene bacterias del ácido acético y especies de levaduras osmofílicas (**Cosio et al., 2020**). La composición microbiana exacta de la kombucha varía dependiendo de la fuente

de inóculo para la fermentación del té y de las condiciones específicas de la preparación (Jayabalan et al., 2014).

La principal vía metabólica de la fermentación de la kombucha (Figura 7) comienza cuando las levaduras fermentan la glucosa y fructosa a etanol, que seguidamente es oxidada por las BAA en ácido acético, siendo el compuesto orgánico dominante en la bebida (Angela et al., 2020). Además, es rica en ácido glucónico, glucorónico, cítrico, L-láctico y vitaminas B1, B2, B6, B12, C, así como 14 aminoácidos (Cosio et al., 2020).

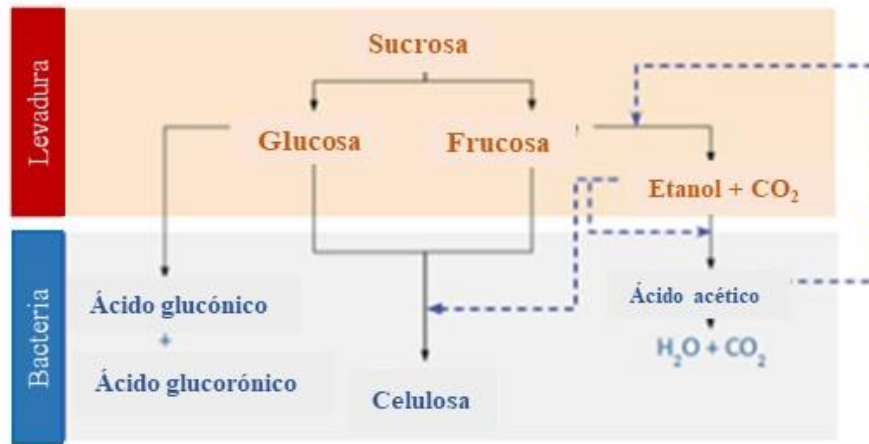


Figura 7. Interacción microbiana en la fermentación del té de kombucha

Fuente: Modificado de Villarreal-Soto et al., (2018).

Entre las bacterias más dominantes presentes en el SCOBY de kombucha destacan los géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Escherichia* (Chakravorty et al., 2016). Además de aquellas productoras de celulosa como *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter kombuchae*, *Gluconacetobacter* sp, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter nitrogenificans*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter liquefaciens*, *Bacterium gluconicum* y *Gluconobacter oxydans* (Jayabalan et al., 2014). Mientras que, la ecología de las levaduras está dominada por *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Mycoderma*, entre otras (Villarreal et al., 2018).

1.1.8. Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana

En los últimos años, se ha incrementado el interés en aplicaciones comerciales de la CB, llevándose a cabo diversos estudios principalmente en la industria alimentaria y biomédica debido a su alta pureza y variedad de formas y texturas (**Carreño et al., 2012**).

Toscano Ávila et al., (2020) emplearon la CB de *Komagataeibacter xylinus* como recubrimiento de mora de castilla y estimaron su vida útil con la finalidad de mejorar sus características fisicoquímicas y nutricionales obteniendo resultados de conservación de sus características iniciales y extensión de su vida útil a 9 días.

Además, la CB es empleada como inmovilizador de probióticos y enzimas. **Fijalkowski et al., (2016)** inmovilizaron cepas probióticas de *Lactobacillus* spp al incluirlas en el medio de cultivo para la producción de CB, demostrando que la CB es útil como soporte de inmovilización para estas cepas, protegiéndolas contra los jugos gástricos.

Otros investigadores como **Wu & Lia, (2008)** inmovilizaron la glucoamilasa en perlas de CB incrementando la estabilidad de la enzima frente a los cambios en los valores de temperatura y pH más bajos.

Por otro lado, se han realizado algunos intentos para controlar la liberación de fármacos a partir de sistemas de administración basados en CB. Con este fin, **Amin et al., (2012)** emplearon CB en polvo para recubrir comprimidos de paracetamol, demostrando que la CB formaba películas blandas de alta calidad, plegables, flexibles y uniformes cuya tasa de liberación del fármaco in vitro dependía del grosor de la película de CB aprovechándose la alta resistencia a la tracción y la tasa de retención de agua de este biopolímero.

La regeneración de tejidos está a la vanguardia de la investigación biotecnológica, **Roman et al., (2019)** aprovecharon la porosidad de la CB para facilitar el crecimiento del

cartílago. El uso de la CB como material de filtración se ha explorado recientemente debido a su red fibrosa en forma de malla, a la cual se han agregado varios compuestos como el óxido de grafeno para obtener filtros de alta resistencia mecánica, convirtiéndose en un método de filtración muy atractivo para la industria farmacéutica y depuración de aguas (Pirsa et al., 2018). En la Tabla 3 se muestra otras aplicaciones de la CB.

Tabla 3. *Ejemplos de algunas aplicaciones comerciales de la CB*

Tipo	Descripción
Diafragma de altavoz acústico	La membrana de la CB se puede emplear para procesar películas acústicas.
Fabricación de papel	La CB se puede modificar para incrementar la resistencia del material para la elaboración del papel.
Apósito para heridas	Es empleada debido a su alta retención de agua, biocompatibilidad y excelente propiedad mecánica.
Vaso sanguíneo artificial	La CB a través de algún recubrimiento de péptidos o tratamiento químico se puede utilizar en ingeniería de tejidos.
Papel electrónico	La CB posee buena conductividad eléctrica si se incorpora con nanopartículas como nano oro o nano carbono.
Biosensor	Para detectar biorreacciones
Perforación del tabique nasal	Puede ser implantado en organismos vivos para alternar algunos tipos de tejidos blandos.
En la refinería	Para la absorción de aceites y toxinas
En la industria textil	Material de elevada absorción acuosa
En la industria cosmética	Empleado como estabilizador de emulsiones, cremas y acondicionadores.

Fuente: Lin et al., (2013).

Por la gran variedad de aplicaciones mencionadas y la necesidad de encontrar sustratos económicos para la producción de biofilms bacterianos, en la presente investigación se plantea el aislamiento y caracterización de una cepa nativa de *Komagataeibacter xylinus* de diferentes fuentes acéticas y la posterior comparación de su crecimiento en diferentes sustratos como el suero de leche y etilenglicol.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* para su comparación de crecimiento en diferentes sustratos.

1.2.2. Objetivos específicos

Aislar una cepa nativa de *Komagataeibacter xylinus* de diferentes fuentes acéticas como vinos y vinagres.

Identificar y comparar la cepa nativa con la cepa tipo *K. xylinus* DSM2004.

Realizar una prueba de producción de biofilms con la cepa nativa y la cepa tipo a partir de suero de leche y etilenglicol.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Matraz 1000 mL
- Probetas 10 ml
- Probetas de 100 mL
- Tubos Falcon de 50 mL
- Buretas
- Pipetas
- Micropipetas de volumen variable
- Balones de aforo
- Cajas Petri de vidrio
- Mechero
- Espátulas estériles
- Gradillas
- Pinza metálica
- Frascos de tapa azul
- Papel aluminio
- Papel film
- Papel filtro
- Fundas ziploc
- Papel absorbente
- Papel industrial
- Puntas para pipetas de 200 μ L, 1 mL, 10 mL
- Asa de siembra
- Esferas de cristal
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas
- Rotuladores

2.1.2. Reactivos

- Extracto de levadura
- Peptona
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- Agar nutritivo
- Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
- D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Carbonato de calcio (CaCO_3)
- Medio MRS
- Suero de leche
- Etilenglicol

- Cristal violeta
- Lugol
- Safranina
- Alcohol 70%
- Kit comercial PureLink®
Genomic DNA kits for
purification of genomic DNA

2.1.3. Equipos

- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110)
- Agitador incubador orbital (Shaker mini-Benchmarle)
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- Incubadora (Isotherm)
- Refrigerador (LG)
- pHmetro (Mettler Toledo Seven Compact)
- Ultra congelador (Binder)
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIRR)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Centrífuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen)
- Vórtex MIXER
- Termociclador (MULTIGENE OPTIMAX)
- Baño seco digital (AccuBlock)
- Nano drop (Thermo Scientific)

2.1.4. Recursos tecnológicos

- Base de datos BLAST de NCBI
- Software MEGA X

2.2. Métodos

2.2.1. Medios de cultivo para el aislamiento de *Komagataeibacter xylinus*

Para la obtención de medio sólido de los diferentes medios de cultivo (Tabla 4 y 5) se adicionó 15 g de agar por cada litro de medio.

2.2.1.1. Medio H-S

Para el aislamiento de la bacteria *K. xylinus* se utilizó un medio estándar para el cual se empleó la metodología descrita por **Hestrin & Schramm, (1954)** con el uso del medio H-S para la producción de CB, el cual se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes del medio de cultivo H-S

Componentes	g/L	pH
Glucosa	20	
Peptona	5	
Extracto de levadura	5	6
Fosfato disódico	2.7	
Ácido cítrico	1.15	

Fuente: **Hestrin & Schramm, (1954)**.

2.2.1.2. Medio GYC

El medio GYC (glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio) es empleado para aislar bacterias del ácido acético, siendo considerado un medio estándar de crecimiento, el cual es capaz de detectar la presencia de microorganismos productores de ácido (**Sharafi et al., 2010**). Para el aislamiento de *K. xylinus* se empleó el medio GYC, cuya composición se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. *Componentes del medio de cultivo GYC*

Componentes	g/L	pH
Glucosa	100	
Extracto de levadura	10	6.8
Carbonato de calcio	20	

Fuente: Sharafi et al., (2010).

2.2.1.3. Medio H-S – Etilenglicol/suero de leche fermentado

El medio de cultivo H-S fue modificado sustituyendo totalmente la glucosa por etilenglicol y suero de leche fermentado (Tabla 6) para evaluar los efectos de los diferentes medios de cultivo sobre la producción de la CB.

Tabla 6. *Componentes de los medios de cultivo H-S modificados*

Componentes de los medios modificados		g/L	pH
Suero de leche fermentado	Etilenglicol	20	
Peptona	Peptona	5	6.8
Extracto de levadura	Extracto de levadura	5	
Fosfato disódico	Fosfato disódico	2.7	
Ácido cítrico	Ácido cítrico	1.15	

2.2.1.4. Medio K-suero de leche fermentado/etilenglicol

Se empleó el medio k (Tabla 7), el cual es un medio económico diseñado con el fin de probar bajar los costos de producción de CB.

Tabla 7. Componentes de los medios de cultivo K-suero de leche/etilenglicol

Componentes	g/L	pH
Suero de leche fermentado o etilenglicol	20	6.5
Peptona	20	
Extracto de levadura	5	
Ácido cítrico	1.2	

2.2.2. Obtención del suero de leche fermentado

Para la obtención del suero de leche fermentado se sembró en un matraz de 500 mL, 2 g de una cepa de *Lactobacillus* en 200 mL de medio MRS y se incubó a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, en un matraz se añadió 200 mL de suero de leche y 50 mL del cultivo obtenido y se incubó a 37°C a 200 rpm durante 3 horas. Finalmente, se obtuvo el suero de leche fermentado el cual fue empleado en la preparación de los medios líquidos.

2.2.3. Obtención de biofilms a partir de la cepa comercial *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004

Para la obtención del biofilm a partir de los medios líquidos H-S, H-S suero de leche fermentado/etilenglicol, K- suero de leche fermentado/etilenglicol se empleó la cepa comercial *Komagataeibacter xylinus* DSM2004. La cepa de fue adquirida de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y fue proporcionada por el grupo del Dr. Pastor del Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

En un tubo falcon se colocó 15 mL del medio H-S y el biofilm contenido en una caja Petri de la cepa DSM 2004, se llevó al vórtex por 15 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, en 3 matraces Erlenmeyer de 125 mL se colocó 25 mL de medios líquidos

(H-S, H-S etilenglicol, H-S suero de leche) en cada matraz con 1 mL del contenido del cultivo y se incubó a 25°C por 15 días y se observó diariamente la formación del biofilm.

Además, se realizaron estriados compuestos de la cepa en medio H-S sólidos contenidos en cajas Petri, y se agregó 50 µL del cultivo del tubo falcon y se llevó a incubar a 30°C por 48 horas. Estos cultivos en Agar sirvieron para realizar la conservación de la cepa en 15% de glicerol y la identificación morfológica por tinción Gram convencional.

2.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas productoras de CB a partir de vino, vinagre de vino, té de kombucha y SCOBY de kombucha

El aislamiento de las cepas *K. xylinus* productoras de CB se realizó a partir de una muestra de vino, vinagre de vino y té de kombucha empleando los medios de cultivo H-S y GYC sólidos. Para ello, se realizó diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-7} para el vino y vinagre de vino y 10^{-1} - 10^{-10} para el té de kombucha) en tubos de ensayo, donde se sembraron 1 mL de las muestras en 9 mL de agua peptonada en cada uno de los tubos, posteriormente se tomó una alícuota de 100 µL del cultivo de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} para las muestras de vino y vinagre de vino y 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} para el té de kombucha y se resembraron en placas en medios de cultivo sólido (HS-agar y GYC-agar) por triplicado para comenzar con el aislamiento y purificación de las cepas. Finalmente se incubó a 30°C durante 72 horas (Gullo et al., 2017) y se observó diariamente el crecimiento bacteriano.

Para el aislamiento de las cepas de *K. xylinus* a partir del SCOBY de kombucha empleando los medios de cultivo H-S y GYC sólidos, se tomó una pequeña cantidad de SCOBY en 50 mL de medio H-S líquido contenido en un matraz y se llevó al vórtex durante 10 minutos para que las bacterias se desprendan. Posteriormente, se tomó 1 mL del contenido del matraz y se realizó diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-6}) en tubos de ensayo, donde se sembró 1 mL de la muestra en 9 mL de agua peptonada en cada uno de los tubos, luego se tomó una alícuota de 200 µL del cultivo de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} y se resembraron en placas en medios de cultivo sólido (HS-agar y GYC-agar) por triplicado para comenzar

con el aislamiento y purificación de las cepas. Finalmente, se incubó a 25°C durante 72 horas y se observó diariamente el crecimiento bacteriano.

2.2.5. Selección de cepas bacterianas productoras de CB a partir de vino, vinagre de vino, té de kombucha y SCOBY de kombucha

Se seleccionó cepas bacterianas de las cajas Petri con medios H-S y GYC agar inoculadas con las muestras de vino, vinagre de vino, té de kombucha y SCOBY y se realizó estriados compuestos en medio H-S sólido por triplicado. Finalmente, se incubó a 30°C (muestras de vino, vinagre de vino y té de kombucha) y 25°C (muestras de SCOBY) por 72 horas.

2.2.6. Obtención de los biofilms en medios líquidos

A partir de los cultivos puros obtenidos en placa de las muestras de vino, vinagre de vino y té de kombucha, se tomó el contenido de la mitad de cada placa con el empleo de una asa de siembra y se depositó en un tubo falcon (para cada cepa) que contenía 5 mL de medio H-S estándar y se llevó al vórtex durante 10 minutos para posteriormente llevar a cabo ensayos por triplicado en cajas Petri, donde se colocó 15 mL de medios líquidos (H-S, H-S suero de leche fermentado/etilenglicol, K-suero de leche fermentado/etilenglicol) con 0.5 mL del inóculo y se incubaron a 30°C durante 15 días en condiciones estáticas.

Para los cultivos en placa obtenidos a partir de la muestra de SCOBY de kombucha y la cepa comercial DSM2004, se tomó el contenido de una placa entera y se depositó en un vaso de precipitado (para cada cepa) que contenía 50 mL de medio H-S estándar y seguidamente se llevó al vórtex durante 10 minutos para posteriormente llevar a cabo ensayos por duplicado en matraces Erlenmeyer de 100 mL y vasos de precipitación de 100 mL, los cuales contenían 2 mL de inóculo en 50 mL de medios líquidos (H-S, H-S suero de leche fermentado/etilenglicol, K-suero de leche fermentado/etilenglicol). Posteriormente, los cultivos se incubaron a 25°C durante 15 días en condiciones estáticas

(Gullo et al., 2019), y mediante observación periódica se identificó la formación del biofilm de celulosa bacteriana en los medios.

2.2.7. Conservación de las cepas productoras de CB

Para la conservación de las cepas seleccionadas se realizó cultivos en tubos Falcon que contenían una cuarta parte de las colonias contenidas en una caja Petri depositadas en 5 mL de medio H-S estándar, los cuales seguidamente se incubaron a 37 °C a 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se añadió 750 µL de glicerol estéril (15%), seguidamente se llevó al vórtex por 30 segundos y finalmente se colocaron en tubos eppendorf debidamente rotulados y se ultracongelaron a -80°C.

2.2.8. Recuperación de la CB

La película de CB sintetizada fue retirada manualmente de los cultivos mediante el empleo de una pinza metálica y posteriormente se sumergió en una solución de NaOH al 1% y llevada a una temperatura de 60°C durante 10 minutos, luego se realizaron lavados repetidos con agua destilada y se empleó fenolftaleína para comprobar la neutralización completa (Zhang et al., 2018). Finalmente, las películas fueron pesadas en la balanza analítica para evaluar la diferencia entre ellas.

2.2.9. Identificación morfológica de las cepas aisladas

La identificación de las cepas aisladas se basó en la identificación de las características morfológicas, para lo cual se aplicó una tinción Gram convencional para cultivos frescos de todas las cepas seleccionadas a partir de los cultivos en placa de los medios H-S y GYC. La morfología celular, el tamaño, el movimiento y la presencia de esporas se determinaron mediante microscopía óptica (Zhang et al., 2018).

2.2.10. Extracción del ADN genómico

Se empleó el protocolo del PureLink® Genomic DNA kits para preparar el lisado de células bacterianas Gram negativas. Para ello, se llevó a cabo un día anterior un cultivo de cada una de las cepas en 5 mL de medio H-S estándar incubado a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. En primer lugar, se llevó a cabo la lisis celular donde se resuspendió el sedimento celular en 180 µL de tampón de digestión genómico PureLink® y se agregó 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se mezcló por un breve periodo en el vórtex. Posteriormente, se llevó a incubar a 55°C durante 30 minutos, finalizado el tiempo se agregó 20 µL de RNAasa (20 mg/mL) al lisado, luego se mezcló bien en el vórtex por un breve periodo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego, se agregó 200 µL de tampón de unión/lisis genómica PureLink® y se mezcló bien hasta obtener una solución homogénea. Finalmente, se añadió 200 µL de etanol al 96-100% al lisado y se mezcló en el vórtex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.

En columnas de centrifugado PureLink® se transfirió cada lisado (aproximadamente 640 µL) y se centrifugó a 2250 rpm durante 10 minutos, luego se desechó el sobrenadante y se añadió 500 µL de tampón de lavado 1 a la columna y se centrifugó nuevamente a 2250 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, se desechó el sobrenadante y se añadió 500 µL de tampón de lavado 2 a la columna y se centrifugó a 2250 rpm durante 15 minutos.

Finalmente, la columna de centrifugado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se añadió 180 µL de tampón de elución genómico PureLink® (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, seguidamente se centrifugó a 2250 rpm durante 3 minutos y se desechó la columna y se obtuvo el ADN genómico purificado en el tubo eppendorf, el cual fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado.

1.2.11. Identificación molecular de las bacterias aisladas

La identificación molecular que incluye la amplificación de ADN 16S por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), electroforesis en gel de agarosa, purificación y cuantificación de ADN, secuenciación y alineamiento de secuencias de las cepas aisladas se realizó en el laboratorio ID-Gen.

El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/ μ L para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizó los primers universales 27F/1492R para la amplificación. Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER, las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos. Finalmente se comparó las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Producción de biofilms con la cepa comercial *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004

Para la obtención de biofilms a partir de la cepa comercial *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 empleando diferentes fuentes de carbono como el suero de leche, etilenglicol y glucosa, se utilizó 25 mL de medios líquidos H-S estándar, H-S suero de leche y H-S etilenglicol para verificar la viabilidad de la cepa en producir celulosa bacteriana (CB) en condiciones estáticas a 30°C.

En la Figura 8A, se puede visualizar la síntesis de CB a partir del día 3 de incubación únicamente en el medio H-S estándar, el cual obtuvo una producción del biofilm de mayor grosor, resistencia y de apariencia firme a los 15 días de incubación (Figura 8B) a diferencia de los medios que contenían suero de leche y etilenglicol, en donde no se formó el biopolímero.



Figura 8. Formación de CB por *Komagataeibacter xylinus* DSM2004. A: 3 días de incubación; B: 15 días de incubación

Jozala et al., (2015) y **Tsouko et al., (2015)** señalan que la familia *Acetobacteraceae* a la que pertenece la especie *Komagataeibacter xylinus* no es capaz de hidrolizar debidamente la lactosa (componente principal del suero) por no poseer el gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa, enzima responsable de su hidrólisis. Además, según **Bossi et al., (2006)**, la actividad relativamente débil de las proteasas podría ser insuficiente para permitir que las acetobacterias (BAA) obtengan las sustancias necesarias para su crecimiento en el suero.

A pesar de que no se ha elucidado el mecanismo y la regulación de las enzimas implicadas en la captación de lactosa en las cepas de *Acetobacter* (**Battad et al., 2004**), existen algunos estudios que han informado sobre su producción en determinadas cepas.

Jozala et al., (2015) obtuvieron un rendimiento bajo (5.9 mg/mL) de CB por parte de las células de *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 5358 en un medio que contenía suero, en comparación con el medio que contenía frutas podridas (60 mg/mL), lo cual demuestra que este tipo de bacterias metabolizan preferentemente monosacáridos como fructosa y glucosa. Sin embargo, en un estudio realizado por **Raiszadeh et al., (2020)** demostraron que *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 produjo mayores cantidades de CB (1.88 g/100 mL) cuando se utilizó el suero de leche en combinación con otros sustratos como el jarabe de dátil como únicas fuentes de carbono.

A pesar de que en el cultivo que contenía etilenglicol no se evidenció ningún tipo de formación del biofilm en los 15 días de incubación, algunos autores han reportado la síntesis de CB a partir de este sustrato, aunque en cantidades mínimas.

Lu et al., (2011), reportó que la adición del 0.5% de etilenglicol al medio H-S estándar a pH 5 produjo 105.5 mg/100 mL de producción de celulosa en la cepa *Komagataeibacter xylinus* 186 en condiciones estáticas cultivado a 30°C durante 6 días, mientras que **Pin & Duck, (2001)**, solo obtuvo 0.02 g/L (1%) de producción de CB por *Acetobacter xylinum*, a diferencia de 2.78 g/L obtenido con glucosa.

3.1.2. Aislamiento de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* a partir de fuentes acéticas

Se realizó el aislamiento a partir de una muestra de vino, vinagre de vino y té de kombucha, en medios GYC y H-S agar de diferentes diluciones para obtener cepas productoras de CB. Se sembró las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} por triplicado para todas las muestras, donde se observó el crecimiento de colonias únicamente en las muestras de vino y vinagre de vino (Figura 9A y Figura 9B) a partir de las 48 horas de incubación a 30°C en ambos medios de cultivo.

No se evidenció crecimiento bacteriano en ningún medio de cultivo que contenía muestra de té de kombucha, probablemente debido a que la muestra estaba muy diluida, a la poca carga bacteriana presente en el té o a la temperatura de incubación, ya que según **Jayabalan et al., (2014)** la temperatura óptima de fermentación del té de kombucha se encuentra en el amplio rango de 18°C a 26°C, siendo ideal para el desarrollo de los microorganismos que la componen (bacterias ácido acéticas, bacterias lácticas y levaduras).

Además, **Entani et al., (1985)**, manifiesta la dificultad de aislar BAA a partir de vinos, vinagres y té de kombucha, debido al estrés ocasionado por la diferencia de los componentes presentes en los medios de cultivo a escala de laboratorio, los cuales contienen menor concentración de etanol o ácido acético.

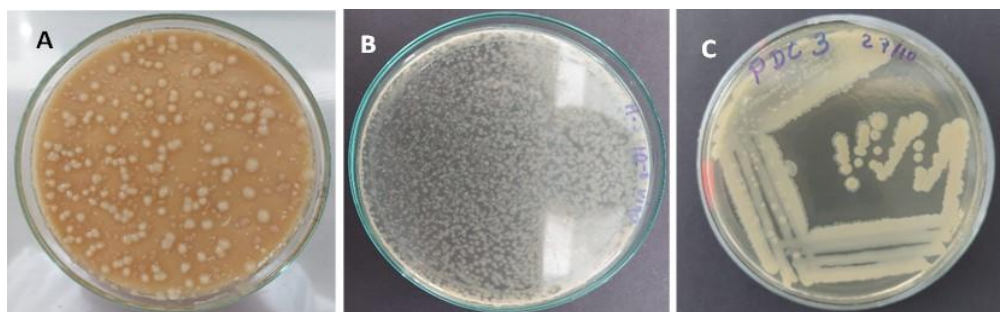


Figura 9. Aislamiento de cepas de *Komagataeibacter xylinus* a partir de muestras de A: vinagre (medio GYC); B: vino (medio H-S); C: Ejemplo de una cepa aislada de vino

Se seleccionaron en total 10 colonias: 3 de la placa con medio H-S que contenía muestra de vino en la dilución 10^{-7} , 3 de la placa con medio GYC con muestra de vino 10^{-7} y 4 de la placa con medio GYC con muestra de vinagre en la dilución 10^{-7} .

Las colonias fueron reconocidas por sus características macroscópicas, colonias de tamaño muy pequeño, de color blanco a crema con estructura mucosa. Además, estas fueron escogidas visualmente a través de la formación de un halo claro a su alrededor para aislar especies de BAA con alta probabilidad (**Sharafi et al., 2010**), debido a que según **Gullo et al., (2006)**, este tipo de bacterias producen ácido acético a partir de glucosa, el cual se revela típicamente por la disolución del carbonato de calcio (CaCO_3) presente en el medio GYC, siendo el motivo principal por el cual la mayoría de las colonias se seleccionaron de este tipo de medio.

Con las colonias seleccionadas se realizaron estriados compuestos en medio H-S estándar para aislar cepas puras y realizar las pruebas de formación de CB en los diferentes medios de cultivo. A las cepas se le asignaron los códigos PDC, seguido del número de colonia seleccionada (PDC 1-PDC 10) (Figura 9C).

Como prueba preliminar, las 10 cepas aisladas se incubaron en medio H-S líquido a 30°C durante 15 días para verificar si eran capaces de producir CB a partir de glucosa como fuente de carbono.

3.1.3. Obtención de biofilms a partir de las cepas aisladas de vino y vinagre de vino

Entre las 10 cepas aisladas, se observó que ninguna tuvo la capacidad de sintetizar CB a partir de glucosa en el medio H-S estándar en 15 días de incubación. A partir del segundo día hasta el día 15, solo se evidenció el crecimiento bacteriano debido a que el medio se volvió más turbio. Se observó la aglomeración de bacterias que otorgaban un color blanquesino al medio de cultivo (Figura 10) sin llegar a formar el biofilm. A excepción de las demás cepas, el cultivo PCD 3 aún conservaba el color del medio de cultivo H-S inicial.

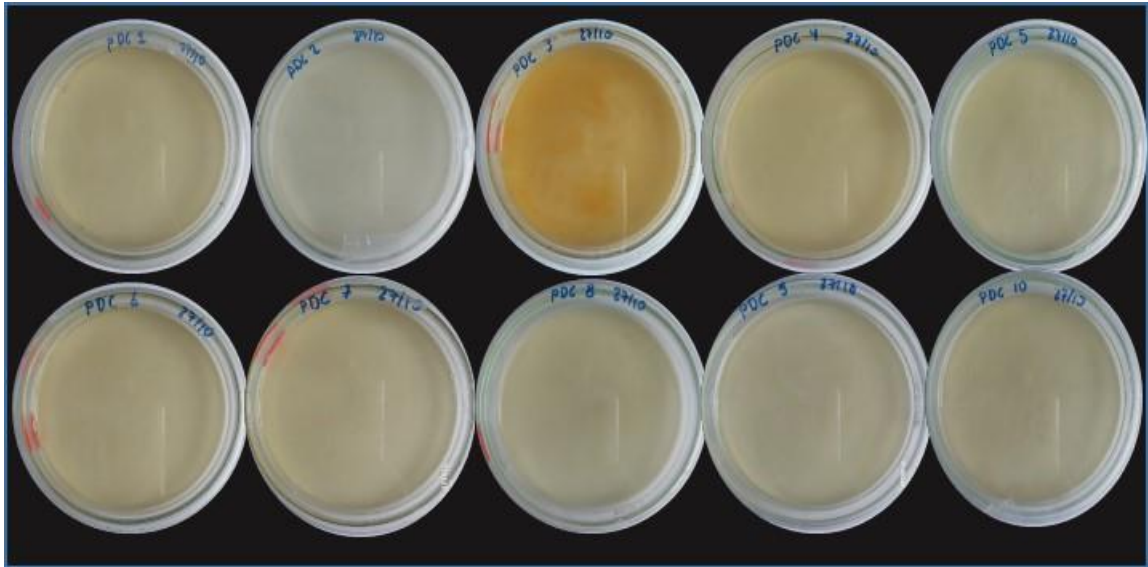


Figura 10. Prueba preliminar de formación de CB por las cepas PDC 1- PDC 10 en medio H-S estándar

A pesar de que se ha reportado que en el vinagre las principales especies existentes pertenecen al género *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, y *Komagataeibacter* (Nakano & Fukaya, 2008), en el presente estudio no se logró aislar bacterias; esto pudo deberse a que las BAA son considerados microorganismos viables pero no cultivables (VBNC), nutricionalmente exigentes y difíciles de aislar y cultivar en medios artificiales, especialmente a partir de bebidas fermentadas y de ambientes con altos niveles de ácido acético (Sengun & Karabiyikli, 2011).

De los abundantes tipos de medios de cultivo propuestos para el aislamiento de cepas de BAA, no todos los medios apoyan su crecimiento y pueden ser selectivos de una cepa u otra (Gomes et al., 2018). Los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* fueron principalmente aislados de medios que contenían ácido acético y etanol en su composición, tales como los medios RAE (ácido acético-etanol reforzado), AE (ácido acético-etanol) (Entani et al., 1985) los cuales son usualmente empleados por favorecer su aislamiento al simular de mejor forma su hábitat (Shuller et al., 2000).

Sin embargo, diversos estudios han demostrado el aislamiento de bacterias productoras de CB de muestras de vinos y vinagres en medio Hestrin-Schramm (H-S). **Lavasani et al., (2017)** aislaron e identificaron 43 cepas de *K.xylinus* a partir de vinagres tradicionales, **Zuluaga et al., (2013)**, aislaron *Gluconacetobacter medellinensis* a partir de una muestra de vinagre, mientras que **Vegas et al., (2013)**, detectaron la presencia de *Gluconacetobacter xylinus* y *Gluconacetobacter europaeus* en el vinagre de vino.

Se seleccionaron nuevamente 10 colonias para aislarlas en medio H-S agar: 5 colonias de dos placas con medio GYC que contenían muestras de vino en la dilución 10^{-6} , 3 colonias de dos placas con medio GYC que contenían muestras de vino en la dilución 10^{-5} y 2 colonias de una placa con medio GYC que contenía muestra de vino en la dilución 10^{-7} .

De igual manera, se observó el crecimiento a partir de las 48 horas de incubación a 30°C. Cabe señalar que algunas colonias seleccionadas como posibles productoras de CB, no presentaban el halo representativo de disolución del carbonato de calcio, debido a que **Gullo et al., (2006)**, mencionan que muchas bacterias al pasarlas a medio sólido pierden la capacidad de producir ácido acético.

Las nuevas cepas aisladas (PDC 11 - PDC 20) fueron sometidas nuevamente a pruebas de formación de CB (Anexo 3), incubándose en medio H-S líquido a 30°C durante 15 días. De igual forma, no se observó la formación del biofilm en ninguna de ellas, obteniéndose los mismos resultados anteriores, donde los medios se volvieron blanquecinos reflejándose la reducción de la concentración de los componentes nutricionales del medio de cultivo para su crecimiento, más no para la producción de CB.

3.1.4. Aislamiento de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* de SCOBY de kombucha

De una muestra de SCOBY de kombucha de 2 años de antigüedad, se llevó a cabo una prueba de producción de CB en los medios líquidos H-S estándar, H-S suero de leche fermentado y H-S etilenglicol con la finalidad de corroborar la presencia de cepas nativas

productoras del biofilm. Se incubó a 30°C durante 7 días, 2 mL de la muestra de SCOBY previamente llevada al vórtex en 50 mL de los medios mencionados. En paralelo se aislaron bacterias en medios H-S y GYC agar de la muestra de SCOBY de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} por triplicado, y se incubaron a 25°C durante 72 horas.

En ambos casos no se evidenció la formación de CB ni crecimiento de bacterias en los aislamientos realizados, se observó únicamente el aglutinamiento de bacterias y la turbiedad del medio de cultivo, esto pudo ser debido al tiempo de antigüedad del SCOBY, el cual tenía una coloración marrón oscuro.

Posteriormente, de una muestra de SCOBY fresca, se realizó del mismo modo una prueba preliminar de formación de CB en los mismos medios mencionados incubándose a 25°C durante 7 días, mientras que en paralelo se aislaron bacterias productoras de CB en medios H-S y GYC agar de la muestra de SCOBY de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} por triplicado incubadas a 25°C durante 72 horas.

En la figura 11 se observa la formación de ligeras capas finas de biofilm en la superficie de los medios, especialmente más evidente en el medio que contenía glucosa como fuente de carbono (Figura 11A).

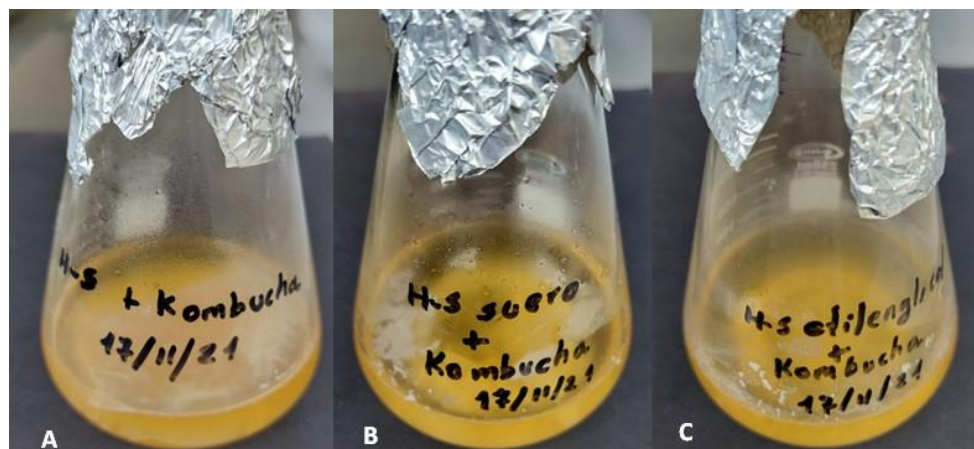


Figura 11. Formación de biofilms a partir de un inóculo de SCOBY de kombucha en medios A: H-S; B: H-S suero de leche fermentado; C: H-S etilenglicol

En la Figura 12A, se visualiza el crecimiento de colonias bien definidas de color crema con variabilidad de tamaños en el medio H-S agar, mientras que en el medio GYC se evidenció la presencia de escasas colonias.

Se seleccionaron 20 colonias (Anexo 4) (PDC 21 – PDC 40): 14 de las placas con medio H-S de la dilución 10^{-2} y 6 de las placas con medio H-S de la dilución 10^{-4} para aislar cepas puras formadoras de CB mediante estriados compuestos en medio H-S (Figura 12B), incubándose a 25°C durante 72 horas.

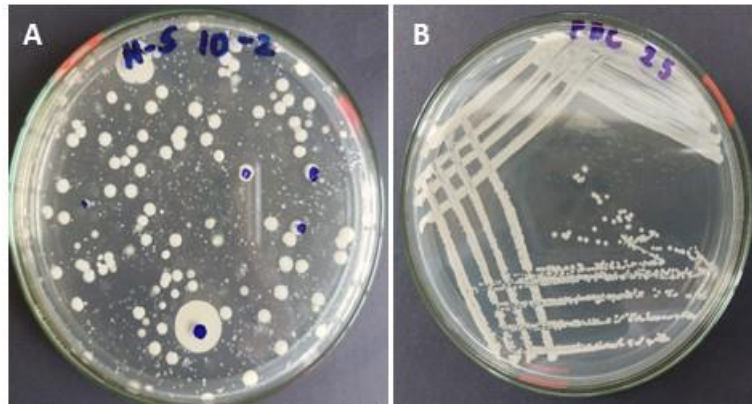


Figura 12. A: Aislamiento de cepas productoras de CB a partir de SCOBY de kombucha; B: Estriado compuesto de una colonia seleccionada

La temperatura fue elegida en base a que varios autores señalan que la temperatura óptima de fermentación del té de kombucha y desarrollo de los microorganismos presentes en el SCOBY se encuentra en el amplio rango de 18°C a 26°C (Jayabalan et al., 2014), 22°C–30°C (Villarreal et al., 2018).

Angela et al., (2020), aislaron cepas de *Komagataeibacter* sp.DS1MA.62A, *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter saccharivorans* y *Gluconacetobacter saccharivorans* a partir de SCOBY del kombucha en medio Hestrin-Schramm (HS) a 28°C durante 72 horas.

Cannazza et al., (2021), aislaron y caracterizaron una cepa de SCOBY de kombucha: *Komagataeibacter rhaeticus* ENS9b a partir de los medios H-S y GYC incubado a 30°C por 3 a 5 días. **Treviño et al., (2020)**, obtuvieron mejores rendimientos de CB a partir de dos tipos de consorcios de microorganismos presentes en el SCOBY de kombucha a 25°C durante 15 días.

3.1.5. Obtención de biofilms a partir de las cepas aisladas del SCOBY de kombucha

De las 20 cepas aisladas (PDC 21 – PDC 40), se realizaron pruebas de formación de CB en 15 mL de medio H-S líquido en cajas Petri, a 25°C en condiciones estáticas durante 15 días (Anexo 5).

Se identificó que a partir del quinto día de incubación, las cepas PDC 21 y PDC 25 formaron un biofilm de apariencia transparente con ligeras aglutinaciones de color blanco (Figura 13), los cuales incrementaron su grosor con el transcurso de los días, a diferencia de las demás cepas que no lograron sintetizar CB hasta el día 15.

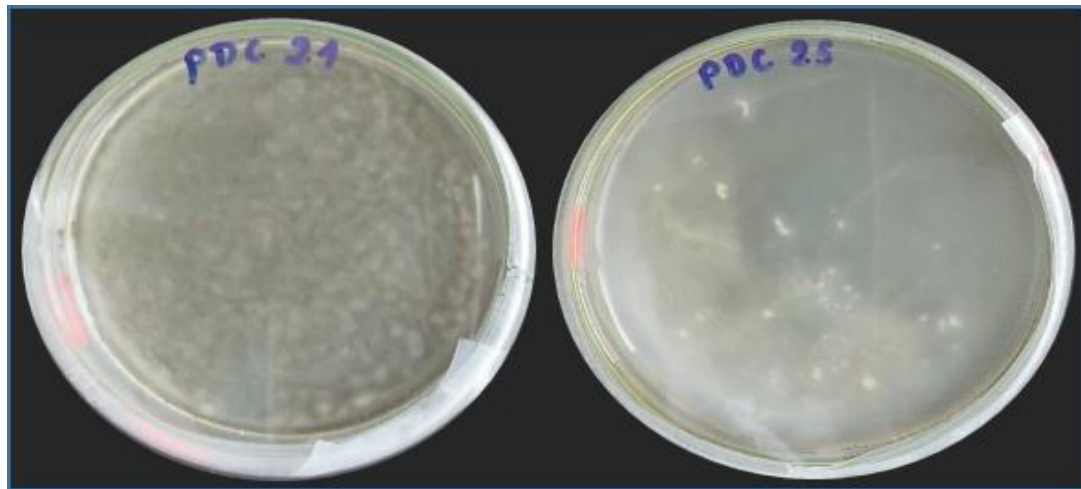


Figura 13. Formación de CB por las cepas PDC 21 y PDC 25 en medio H-S estándar

Las demás cepas aisladas no lograron la formación de CB, probablemente se deba a que el scoby se compone de bacterias del ácido acético (BAA), bacterias del ácido láctico (BAL) y levaduras **Chakravorty et al., (2016)**.

Posterior a la identificación de las dos cepas productoras de CB, se llevó a cabo pruebas de formación de biofilms con los diferentes medios de cultivo para evaluar su capacidad de consumir sustratos alternativos a la glucosa.

3.1.6. Comparación de la producción de CB entre *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 y las cepas aisladas

A partir de las dos cepas aisladas se realizó una comparación de producción de CB con la cepa comercial *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 en los medios de cultivo H-S estándar, H-S suero de leche fermentado, H-S etilenglicol, K-suero de leche y K-etilenglicol por duplicado. Para la determinación de la cantidad de CB sintetizada, cada cepa fue cultivada en matraces y vasos de precipitación de 125 mL con 50 mL de a 25°C durante 15 días de incubación.


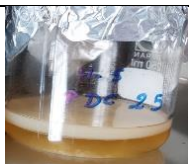
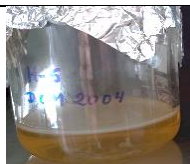
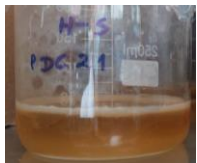
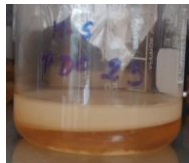
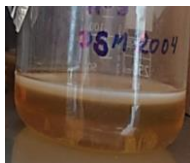


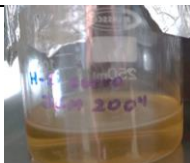
El medio de cultivo H-S suero de leche fermentado fue implementado debido a que en un estudio realizado por **Balseca, (2021)**, se identificó que la cepa *K. xylinus* DSM 2004 fue capaz de producir una membrana gelatinosa compacta en la interfaz aire-líquido a partir de ácido láctico como sustituto de la glucosa. El ácido láctico fue obtenido tras la fermentación del suero de leche, el cual está mayormente compuesto por lactosa empleando *Lactobacillus* spp. (**Rojas et al., 2015**).

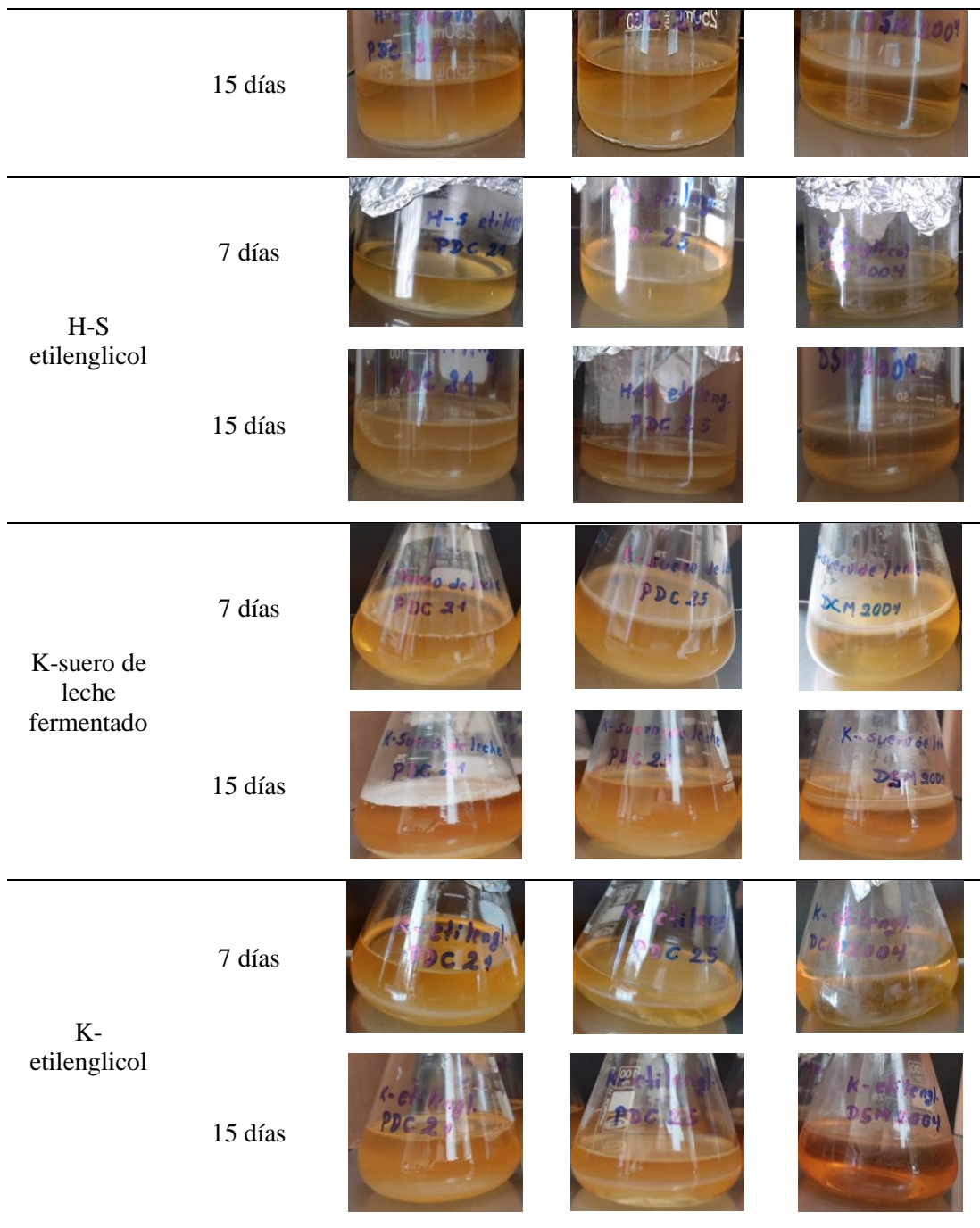
En la Tabla 8 se observa que todas las cepas fueron capaces de sintetizar CB en todos los medios de cultivo. Se realizó una comparación visual entre la cantidad de CB sintetizada entre los 7 y 15 días de incubación en base al grosor del biofilm y reducción del medio de cultivo.

Se evidenció que la cepa PDC25 tanto en el día 7 como en el 15, sintetizó mayor cantidad de este biopolímero en el medio H-S estándar con una reducción de la mitad del medio en el día 7 y las $\frac{3}{4}$ partes en el día 15, dando lugar a la formación de una capa de contextura gruesa, firme y de color crema en la interfaz aire-líquido.

Ross et al., (1991) mencionan que la fuente de carbono más común para la producción de CB en la ruta biosintética del género *Komagataeibacter* es la glucosa, debido a que puede transportarse directamente a la vía de síntesis de celulosa convirtiéndose en uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), sustrato empleado para la producción de CB por la enzima celulosa - sintasa (**Lustri et al., 2015**) o a su vez puede ser obtenida de fuentes internas mediante la vía pentosas fosfato (oxidación de carbohidratos), ciclo de Krebs (oxidación de ácidos orgánicos) o gluconeogénesis a partir del oxalacetato (**Donini et al., 2010**).

Tabla 8. Comparación de formación de CB entre las cepas aisladas y DSM2004

Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Cepas		
		PDC 21	PDC 25	DSM2004
H-S	7 días			
	15 días			
H-S suero de leche fermentado	7 días			



Por otro lado, la producción de CB a partir del medio H-S suero de leche fermentado (ácido láctico) fue visiblemente mayor en la cepa PDC 25 en el día 7 de incubación y similar en el medio K- suero de leche; sin embargo, en el día 15 la cepa *K. xylinus* DSM 2004 obtuvo una mayor producción, identificándose un biofilm más grueso y estable, a

diferencia de las demás cepas cuyos biofilms se situaron en la parte intermedia e inferior del recipiente, debido a la fragilidad de la capa de CB sintetizada.

Matsuoka et al., (1996), sugieren que el lactato estimula el crecimiento celular y aumenta el flujo de carbono en el ciclo del ácido tricarboxílico en la etapa inicial de un cultivo. Además, la oxidación del lactato a piruvato genera energía adicional, lo que podría influir positivamente en la producción de CB (**Cielecka et al., 2021**).

Revin et al., (2018), mencionan que el ácido láctico generado a partir de lactato puede transformarse en acetil-CoA y metabolizarse en el ciclo de Krebs para generar ATP o también puede utilizarse en la vía de la gluconeogénesis, incrementando así la disponibilidad de la glucosa y síntesis de CB.

Finalmente, se observó que la síntesis de CB a partir de etilenglicol fue similar en las tres cepas, con una producción aparentemente mayor en la cepa PDC 25; sin embargo, en todos los casos los biofilms eran visiblemente delgados, frágiles y más translúcidos que los obtenidos con los otros medios, visualizándose una reducción mínima del medio de cultivo.

A pesar de que no existen estudios que revelen la ruta metabólica llevada a cabo por los géneros *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Komagataeibacter* a partir de etilenglicol, se presume que al ser un alcohol, se oxida igual que el etanol, ingresando luego de una serie de reacciones al ciclo del ácido tricarboxílico hasta convertirse en oxalacetato (**Liu et al., 2018**), el cual se puede incorporar a la vía de la gluconeogénesis debido a la regulación inusual de las enzimas oxalacetato descarboxilasa y piruvato fosfato dicinasa (**Benziman et al., 1978; Benziman & Eizen, 1971**), formando finalmente glucosa-6-fosfato para ser aprovechada en la síntesis de CB (**Ross et al., 1991**).

Además, el etanol al igual que el lactato tiene un efecto inductor particularmente fuerte sobre la producción de CB (**Cielecka et al., 2021**).

3.1.7. Obtención de los pesos de celulosa bacteriana y comparación entre las cepas aisladas

En la Tabla 9 se presenta el peso en húmedo de los biofilms obtenidos de los diferentes medios de cultivo en las 3 cepas evaluadas después de 15 días de fermentación. Las películas obtenidas fueron de forma circular debido a la conformación del recipiente usado para su producción. La mayor parte de biofilms presentaron buena flexibilidad, eran de color crema claro y unos más cristalinos que otros (Anexo 6).

La cepa PDC 25 obtuvo una producción de CB de casi 8 veces más (23.71 g) en el medio H-S estándar en comparación con la cepa de control *K. xylinus* DSM 2004 (2.98 g) y 19.59 veces más que la cepa PCD 21 (1.21 g), mientras que en los medios H-S etilenglicol y K-etilenglicol produjo 1.4 y 3.46 veces más respectivamente que la cepa de control.

Los biofilms obtenidos a partir de glucosa (medio H-S) poseían un mayor grosor con una estructura firme, difícil de romper y menos translúcidos, mientras que los sintetizados con etilenglicol eran más delgados, transparentes y flexibles, a diferencia de PDC 21 (medio H-S etilenglicol) que era de estructura delicada, rompiéndose al momento de manipularlo, mientras que los obtenidos por *K. xylinus* DSM 2004 en los medios H-S/K-etilenglicol eran más firmes y flexibles.

Estos resultados son consistentes con estudios mencionados anteriormente que demuestran que bacterias del género *Komagataeibacter* son capaces de metabolizar el etilenglicol, aunque los rendimientos obtenidos hayan sido por lo general bajos.

Por otro lado, PDC 25 produjo cantidades mayores de biofilm en los medios H-S suero de leche fermentado (0.82 g) y K-suero de leche (0.69 g) a diferencia de la cepa PDC 21 que obtuvo valores de 0.23 y 0.47 g respectivamente. Mientras que los biofilms obtenidos por PDC 25 eran más firmes y flexibles, los de PDC 21 eran casi imposibles de manipular por ser demasiado frágiles y delgados.

Sin embargo, *K. xylinus* DSM 2004 obtuvo valores más altos de producción de CB en los medios H-S suero de leche fermentado (2.40 g) y K-suero de leche (1.42 g), con biofilms flexibles, de coloración crema claro y más resistentes que los obtenidos por PDC 25. Estos resultados son concordantes con estudios realizados por **Cielecka et al.,(2021)**, quienes incrementaron el rendimiento de CB (3.83 g/L) añadiendo 0.6% de ácido láctico al medio de cultivo H-S en la cepa *Komagataeibacter xylinus* E25, mientras que **Matsuoka et al., (1996)**, obtuvieron 3.2 g/L de CB en la cepa *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans* agregando 0.15% de lactato.

Además, **Yamada et al.,(2012)**, establecieron que los géneros como *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter*, pueden oxidar el lactato a CO₂ y H₂O, característica que los distingue rápidamente del género *Gluconobacter*, el cual no puede hacerlo.

Tabla 9. Comparación de los pesos en húmedo de CB entre las diferentes cepas

Medios de cultivo	Pesos en húmedo de CB	Cepas		
		PDC 21	PDC 25	DSM 2004
H-S	Peso 1	1.08 g	21.07 g	3.07 g
	Peso 2	1.34 g	26.36 g	2.89 g
	Promedio	1.21 g	23.71 g	2.98 g
H-S suero de leche fermentado	Peso 1	0.10 g	1.06 g	2.11 g
	Peso 2	0.36 g	0.59 g	2.70 g
	Promedio	0.23 g	0.82 g	2.40 g
H-S etilenglicol	Peso 1	0.79 g	1.26 g	0.65 g
	Peso 2	0.44 g	0.70 g	0.72 g
	Promedio	0.61 g	0.98 g	0.68 g
K-suero de leche fermentado	Peso 1	0.46 g	0.79 g	1.63
	Peso 2	0.48 g	0.59 g	1.21
	Promedio	0.47 g	0.69 g	1.42 g
K-etilenglicol	Peso 1	1.25 g	1.15 g	0.54 g
	Peso 2	0.63 g	2.31 g	0.46 g
	Promedio	0.94 g	1.73 g	0.50 g

La baja producción de CB por las cepas PDC 21 y DSM 2004 a partir de glucosa puede atribuirse a que en el proceso de obtención de CB a partir de este sustrato, se generan metabolitos como el ácido glucónico y cetoglucónico, los cuales son capaces de ejercer un estrés ácido en las células provocando una depresión del crecimiento celular y una disminución en el pH del medio afectando la producción de CB (Liu et al., 2016).

Por tal motivo, se han realizado diversos estudios sobre el efecto del pH en el rendimiento de CB por *K. xylinus*, aunque no se ha logrado definir con exactitud el valor ideal debido a que el rendimiento máximo depende de algunos factores como fuente de carbono, sistema de cultivo y, sobretodo, de la variabilidad de la cada cepa (Carreño et al., 2012).

Hwang et al., (1999), obtuvieron un mayor rendimiento de CB a pH 5.0 usando glucosa como única fuente de carbono en un cultivo con *Acetobacter xylinum* BRC5, mientras que a pH 4 la producción disminuyó. En otro estudio Volova et al., (2018), determinaron que el rango de pH óptimo para el mayor rendimiento de CB en *Komagataeibacter xylinus* B-12068 se encontró entre 3.6 y 4.0 en el medio H-S en condiciones estáticas.

3.1.8. Identificación morfológica de las cepas aisladas

Para la identificación morfológica de las cepas PDC 21 y PDC 25, se llevó a cabo una tinción Gram convencional para verificar si correspondían a la descripción de las bacterias del género *Komagataeibacter*. Este tipo de género se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, no esporulados e inmóviles, de 0.5 – 0.8 x 1.0 – 3.0 μm , las colonias son color blanco cremoso y lisas con margen completo o ásperas y crecen en pares o cadenas (Yamada et al., 2012).

En la Figura 14 se muestra los resultados vistos al microscopio (100 X), donde se observó para la cepa PDC 21 (Figura 14A) colonias de bacilos cortos, no móviles, agrupados en pares, cadenas y en pequeños y grandes grupos, mientras que la cepa PDC 25 presentaba

forma de bacilos largos (elipsoidal), Gram negativos, no móviles y localizados en pequeños grupos (Figura 14B).

Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por **Quintana, (2015)**, donde identificó por tinción Gram a la cepa *Gluconoacetobacter xylinus* ATTC 700178 con morfología de bacilo corto, encontrándose como individuos cortos, en pares, cadenas y en pequeños grupos.

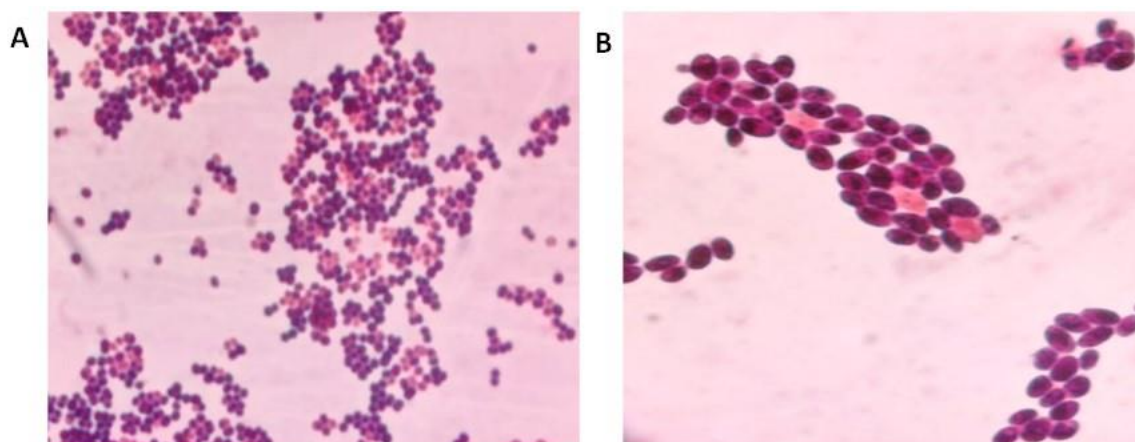


Figura 14. Tinción Gram de cepas A: PDC 21; B: PDC 25 (100 X)

3.1.8. Identificación molecular de las cepas aisladas

Para la identificación molecular se extrajo ADN genómico de ambas cepas empleando el kit comercial PureLink[®] Genomic DNA y se cuantificó en el Nanodrop obteniéndose para PDC 21 y PDC 25, 771.5 y 771.9 ng/ μ L respectivamente, mientras que las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ fueron de 1.52 y 0.61 respectivamente para ambas muestras (Anexos 7 y 8).

La relación $A_{260/280}$ es muy estable e indica la pureza óptima del ADN cuando se encuentra en un valor entre 1.8-2.0; sin embargo, valores < 1.6 indican una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Por otro lado, la relación $A_{260/230}$ debería situarse en torno a 1.8 y 2.2 y valores < 1.8 podría indicar impureza en el ADN (**Desjardins & Conklin, 2010**).

En los resultados obtenidos por el laboratorio ID-Gen para la cepa PDC 25 (Figura 15B) no se amplificó el del gen 16S rRNA con empleo de los primers universales 27F/1492R correspondiente a *Escherichia coli* (Volova et al., 2018), el uso de estos primers al no ser específicos no hibridó con el DNA. Sin embargo, para la cepa PDC 21 se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de PCR. Se ensambló la reacción de PCR visualizándose un fragmento de aproximadamente 1200 pb (Figura 15A) en la muestra amplificada con primers 27F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) /1492R (5-GGTTACCTTGTTACGACTT-30).

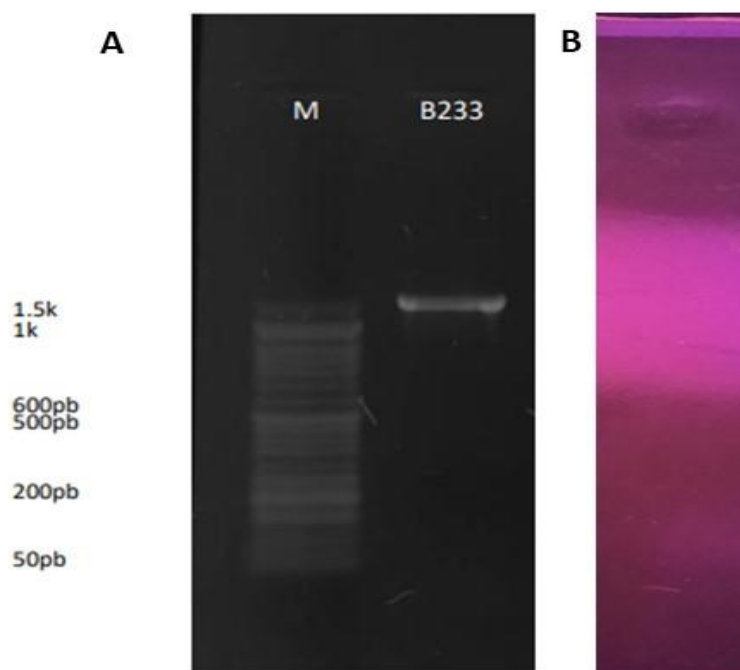


Figura 15. A: Producto amplificado de la cepa PDC 21 de aproximadamente 1200 pb visualizado en gel de agarosa 1% M: Marcador de peso molecular; B: Producto amplificado de la cepa PDC 25

En el proceso de secuenciación por el método SANGER de la cepa PDC 21 se obtuvo dos secuencias crudas, cuyos cromatogramas fueron analizadas en el programa MEGA X (MEGA, 2022). En la Figura 16 se observa la secuencia obtenida por el Primer 1492R de aproximadamente 1400 pb, donde se visualizan a partir de las 1050 pb un cromatograma con mucho ruido debido a posibles causas como contaminación de otro ADN o de otro

cebador utilizado en la PCR y con presencia de señal débil debido a que hay poco ADN molde o el cebador no ha reconocido correctamente al molde (Márquez et al., 2014).

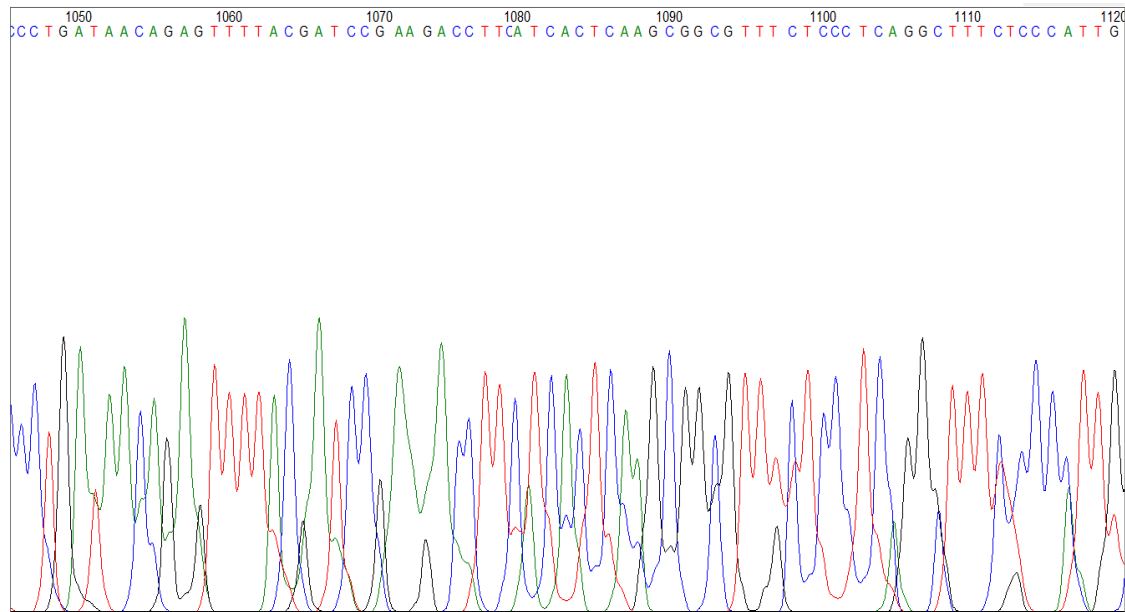


Figura 16. Cromatograma de secuencia cruda de aproximadamente 1400 pb obtenido con el Primer 1492R de la cepa PDC 21 visualizado en MEGA X

Por otro lado, en el cromatograma obtenido por la secuencia del Primer 27F de aproximadamente 590 pb (Figura 17) se visualiza que en toda la extensión de la secuencia existió la presencia de señales con picos bajos, lo cual pudo deberse a causa del ruido o de una pérdida de resolución, motivo principal que origina lecturas de no más de 700-800 pb. Además, estos picos son característicos cuando existe la presencia de un contaminante fuerte que inhibe a la polimerasa, a o la incorrecta eliminación de los cebadores de la PCR original o los ddNTPs mal eliminados de la reacción de secuenciación. (Márquez et al., 2014).

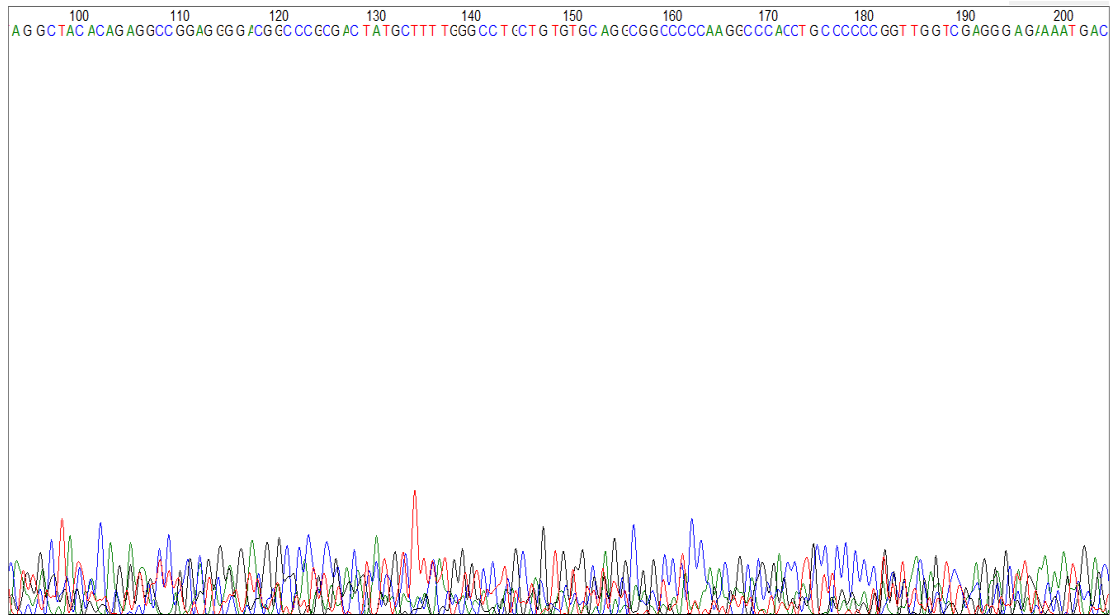


Figura 17. Cromatograma de secuencia cruda de aproximadamente 590 pb obtenido con el primer 27F de la cepa PDC 21 visualizado en MEGA X

Finalmente, se obtuvo una secuencia parcial de 1029 pb (Figura 18), la cual se analizó utilizando la base de datos BLAST de nucleótidos de NCBI (National Center for Biotechnology information) (NCBI, 2022) para proporcionar la identidad bacteriana. Los resultados de acuerdo a la secuencia amplificada de la región 16S revelaron que con un 99.9% de identidad correspondía al microorganismo *Staphylococcus warneri*, patógeno Gram positivo relacionado con infecciones cutáneas y artritis séptica (Rodríguez et al., 2018).

```
GCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCC
GGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATC
CGAACTGAGAACAACCTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTAGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGT
AGCCCAAATCATAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTG
CCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACCTGTCTTTGTCCCCGAAGGGGAAGACTCTATCTCTAGAGCGGTCAAAGGATGTCAAGATTT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGGCGTCTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCATAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTA
GCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTATCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTA
CAGACCAGAAAGTCGCTTCCGCACTGGTGTCTCCATATCTCTGCGCATTTCCACGCTACACATGGAATTCACATTTT
CTTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACC
GCCTACGCGCTTTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAATTAG
CCGTGGCTTCTGATCAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTGATAAC
```

Figura 18. Secuencia parcial de 1029 pb obtenida de la secuencia cruda del Primer 1492R de la cepa PDC 21

De acuerdo a los resultados obtenidos, existen algunas posibles causas sobre el tipo de microorganismo encontrado. Las causas podrían estar ligadas a contaminación a partir de la fuente, es decir del SCOBY de kombucha adquirido externamente, el cual pudo estar contaminado por esta bacteria. Además, pudo ser debido a una incorrecta manipulación en el proceso de extracción del ADN genómico o por parte del laboratorio al cual se envió a secuenciar las muestras.

Sin embargo, la causa principal podría estar ligada al proceso de aislamiento debido a que en los resultados de identificación morfológica por tinción Gram convencional, se evidenció una mezcla de bacilos cortos Gram negativos y positivos, por lo cual se presume que lo que realmente se aisló fue un consorcio microbiano a partir del SCOBY de kombucha.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

A partir de una muestra fresca de SCOBY de kombucha se aisló dos cepas capaces de sintetizar CB en condiciones estáticas en 15 días de incubación en los medios H-S estándar y medios modificados con suero de leche fermentado y etilenglicol como fuentes de carbono.

La cepa PDC 25 sintetizó biofilms de CB de mayor grosor, elasticidad y firmeza en los medios con glucosa y etilenglicol a diferencia de PDC 21 y la cepa control, los cuales fueron más delgados y delicados.

Se identificó que los medios económicos propuestos como K-etilenglicol y K-suero de leche fermentado fueron efectivos para la síntesis de CB en las 3 cepas evaluadas a pesar de no contener fosfato disódico como agente tamponante adicional.

La cepa control produjo cantidades mayores de CB en comparación con las cepas PDC 25 y PDC 21 en los medios que contenían suero de leche fermentado, con lo cual se corrobora que esta especie es capaz de oxidar el lactato a través del ciclo de Krebs incrementando la síntesis de CB.

Los resultados revelaron que la glucosa fue el sustrato preferido por las cepas PDC 25, PDC 21 y *K. xylinus* DSM 2004, lo cual demuestra que este tipo de bacterias emplean la ruta convencional de conversión de glucosa a UDP-glucosa para la síntesis de CB por la enzima celulosa sintasa.

4.2. Recomendaciones

Ampliar estudios sobre los aislamientos obtenidos hasta identificar la presencia de cepas puras con morfología característica de la especie *K. xylinus*.

Realizar nuevamente la extracción del ADN genómico y caracterización molecular de ambas cepas para identificar a la especie *K. xylinus*.

Caracterizar la celulosa producida en términos de capacidad de retención de agua, viscosidad, grado de polimerización, cristalinidad, resistencia mecánica. Además, mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con la finalidad de verificar la pureza y la existencia de grupos funcionales característicos de la CB.

Llevar a cabo ensayos de caracterización diferencial de las cepas aisladas tales como prueba catalasa, oxidación del acetato y del lactato a CO₂ y H₂O, crecimiento en agar glutamato y manitol, producción de ácido acético a partir de etanol, etc., con la finalidad de diferenciar la especie *K. xylinus* del resto de la familia *Acetobacteraceae*.

Realizar la síntesis de celulosa bacteriana en las cepas PDC 21 y PDC 25 empleando otras fuentes de carbono como fructosa, glicerol, manitol, así como la incorporación de aditivos tales como ácidos orgánicos (ácido láctico) o alcoholes (etilenglicol) en combinación con la glucosa para incrementar el rendimiento.

Probar la producción de celulosa bacteriana de las cepas aisladas con fuentes de carbono provenientes de residuos agroindustriales para minimizar los costos, tales como bagazo de caña, salvado de arroz y cáscara de cacao.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Alvarez, V. B., Eastridge, M., & Ji, T. (2011). Utilities and Effluent Treatment: Reducing the Negative Impact of the Dairy Industry on the Environment. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 631–635. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00521-5>
- Amin, M. C. I. M., Abadi, A. G., Ahmad, N., Katas, H., & Jamal, J. A. (2012). Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: Physicochemical, thermal and drug release properties. *Sains Malaysiana*, 41(5), 561–568.
- Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., Virgina 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/cls.v5i2.6444>
- Ashraf, M. A., Batool, S., Ahmad, M., Sarfraz, M., & Noor, W. S. A. W. M. (2016). Biopolymers as biofilters and biobarriers. In *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100214-8.00017-8>
- Balseca, E. (2021). Análisis filogenético de *Komagateibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 para la producción de biofilms a partir de suero lácteo [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32072/1/AL764.pdf>
- Battad, E., McCrindle, S. L., Couperwhite, I., & Neilan, B. A. (2004). Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00007-2)
- Benziman, M., & Eizen, N. (1971). Pyruvate-phosphate dikinase and the control of gluconeogenesis in *Acetobacter xylinum*. *Journal of Biological Chemistry*, 246(1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)62531-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)62531-1)
- Benziman, M., Russo, A., Hochman, S., & Weinhouse, H. (1978). Purification and regulatory properties of the oxaloacetate decarboxylase of *Acetobacter xylinum*.

- Journal of Bacteriology*, 134(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/jb.134.1.1-9.1978>
- Bossi, A., Bonizzato, L., & Zapparoli, G. (2006). Acidic Extracellular Proteases from Microorganisms of Fairly Acidic Niche. *Protein & Peptide Letters*, 13(7), 737–741. <https://doi.org/10.2174/092986606777790647>
- Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 40(2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00050-8)
- Cannazza, P., Rissanen, A. J., Guizelini, D., Losoi, P., Sarlin, E., Romano, D., Santala, V., & Mangayil, R. (2021). Characterization of *Komagataeibacter* isolate reveals new prospects in waste stream valorization for bacterial cellulose production. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112230>
- Carreño, L. D., Caicedo, L. A., & Martínez, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307–335. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-91652012000200012
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Cielecka, I., Ryngajłło, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2021). Response surface methodology-based improvement of the yield and differentiation of properties of bacterial cellulose by metabolic enhancers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.147>
- Cosio, A., Morgan, A., Packard, S., & Young, E. M. (2020). *Engineering Kombucha : Characterization of K. xylinus Major Qualifying Project*.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45, 1–5. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Donini, Í. A. N., De Salvi, D. T. B., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eletica Quimica*, 35(4), 165–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., & Suzuki, K. I. (1985). *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *31*(5), 475–490. <https://doi.org/10.2323/jgam.31.475>
- Fijałkowski, K., Peitler, D., Rakoczy, R., & Zywicka, A. (2016). Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *Lwt*, *68*, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.038>
- Fontana, J. D., Koop, H. S., Tiboni, M., Grzybowski, A., Pereira, A., Kruger, C. D., da Silva, M. G. R., & Wielewski, L. P. (2017). New Insights on Bacterial Cellulose. In *Food Biosynthesis* (Issue 1886). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811372-1.00007-5>
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., & Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar.” *International Journal of Food Microbiology*, *106*(2), 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.024>
- Gullo, M., La China, S., Petroni, G., Di Gregorio, S., & Giudici, P. (2019). Exploring K2G30 genome: A high bacterial cellulose producing strain in glucose and mannitol based media. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00058>
- Gullo, M., Sola, A., Zanichelli, G., Montorsi, M., Messori, M., & Giudici, P. (2017). Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(22), 8115–8127. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8539-3>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *The Biochemical Journal*, *58*(2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- 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)
- Ibrahim, S., Riahi, O., Said, S. M., Sabri, M. F. M., & Rozali, S. (2019). Biopolymers From Crop Plants. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.11573-5>
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1166–1173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110>
- Isobe, N., Komamiya, T., Kimura, S., Kim, U. J., & Wada, M. (2018). Cellulose hydrogel with tunable shape and mechanical properties: From rigid cylinder to soft scaffold. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.071>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jelen, P. (2011). Whey Processing: Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 731–737. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00495-7>
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00197-3)
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Tibereau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 153–156. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.153-156.1984>
- Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A. (2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1181–1190.

<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>

- Kadere, T. T., Miyamoto, T., Oniang'O, R. K., Kutima, P. M., & Njoroge, S. M. (2008). Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2963–2971. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i16.59210>
- Kandasamy, S., Samudrala, S. P., & Bhattacharya, S. (2019). The route towards sustainable production of ethylene glycol from a renewable resource, biodiesel waste: A review. *Catalysis Science and Technology*, 9(3), 567–577. <https://doi.org/10.1039/c8cy02035c>
- Kaur, R., Panwar, D., & Panesar, P. S. (2020). Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. In *Food Industry Wastes*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817121-9.00013-9>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kobayashi, S., Kashiwa, K., Kawasaki, T., & Shoda, S. I. (1991). Novel Method for Polysaccharide Synthesis Using an Enzyme: The First in Vitro Synthesis of Cellulose via a Nonbiosynthetic Path Utilizing Cellulase as Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 113(8), 3079–3084. <https://doi.org/10.1021/ja00008a042>
- Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., & Henrissat, B. (1997). Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17), 9091–9095. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9091>
- Krebsz, M., Pasinszki, T., Tung, T. T., & Losic, D. (2017). Development of Vapor/Gas Sensors from Biopolymer Composites. In *Biopolymer Composites in Electronics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00014-0>
- Kubicek, C. P. (2015). Synthetic biopolymers. In *Synthetic Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22708-5_9
- Lavasani, P. S., Motevaseli, E., Shirzad, M., & Modarressi, M. H. (2017). Isolation and identification of *Komagataeibacter xylinus* from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(6), 338–347.

- Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, *14*(1), 10–32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>
- Lin, S. P., Loira Calvar, I., Catchmark, J. M., Liu, J. R., Demirci, A., & Cheng, K. C. (2013). Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, *20*(5), 2191–2219. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24559-w>
- Liu, M., Zhong, C., Zhang, Y. M., Xu, Z. M., Qiao, C. S., & Jia, S. R. (2016). Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00331>
- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., & Sun, B. (2011). Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 186. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(10), 2281–2285. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0692-8>
- Lustri, W. R., Barud, H. G. de O., Barud, H. da S., Peres, M. F. S., Gutierrez, J., Tercjak, A., de Oliveira, O. B., & Ribeiro, S. J. L. (2015). Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends, Mc*. <https://doi.org/10.5772/61797>
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 231–249. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., & Yoshinaga, F. (1996). A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *60*(4), 575–579. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.575>
- MEGA. (2022). Molecular Evolutionary Genetics Analysis.

<https://www.megasoftware.net/>

- Minteer, S. D. (2011). Biochemical production of other bioalcohols: Biomethanol, biopropanol, bioglycerol, and bioethylene glycol. In *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857090492.2.258>
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, *493*(7431), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature11744>
- Nakano, S., & Fukaya, M. (2008). Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.015>
- 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. <https://doi.org/10.1021/ja953286u>
- NCBI. (2022). National Center for Biotechnology information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., & Langan, P. (2003). Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(47), 14300–14306. <https://doi.org/10.1021/ja037055w>
- Ogumi, Z., & Miyazaki, K. (2009). Fuel Cells - Direct Alcohol Fuel Cells | Direct Ethylene Glycol Fuel Cells. *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, 412–419. <https://doi.org/10.1016/B978-044452745-5.00881-9>
- Pérez, F., Seseña, S., Fernández, M., Arévalo, M., & Palop, M. L. (2014). Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *International Journal of Food Microbiology*, *190*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.020>
- Pin, S., & Duck, Y. (2001). Production and application of functional Bacterial Cellulose. *Food Industry and Nutricion*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1109/jaiee.1926.6537864>

- Pirsa, S., Shamus, T., & Kia, E. M. (2018). Smart films based on bacterial cellulose nanofibers modified by conductive polypyrrole and zinc oxide nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(34), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46617>
- Quintana, M. (2015). Estudio de la producción y caracterización de celulosa por cultivo sumergido de *Gluconacetobacter xylinus* [Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI16907.pdf>
- Raiszadeh, Y., Rezazadeh, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2020). Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2524–2533. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04289-6>
- 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>
- Rodríguez, D., Calle, J., Dellonder, J., Isernia, V., Molinos, S., Hernández, J., & Martínez, J. (2018). Artritis séptica de rodilla por *Staphylococcus warneri*. *Acta Ortopédica Mexicana*, 32(5), 287–290. <https://doi.org/10.35366/84435>
- Rojas, A. M., Montaña, L. P., & Bastidas, M. J. (2015). Produção de ácido láctico de soro de leite coalhado usando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5–10. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>
- Roman, M., Haring, A. P., & Bertucio, T. J. (2019). The growing merits and dwindling limitations of bacterial cellulose-based tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 24, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.03.006>
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58. <https://doi.org/10.1128/mbr.55.1.35-58.1991>
- Roy, W. R. (2016). The Environmental Fate of Representative Antistatic Agents and Components. In *Handbook of Antistatics* (Second Edi). ChemTec Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-1-895198-95-9.50022-4>
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food

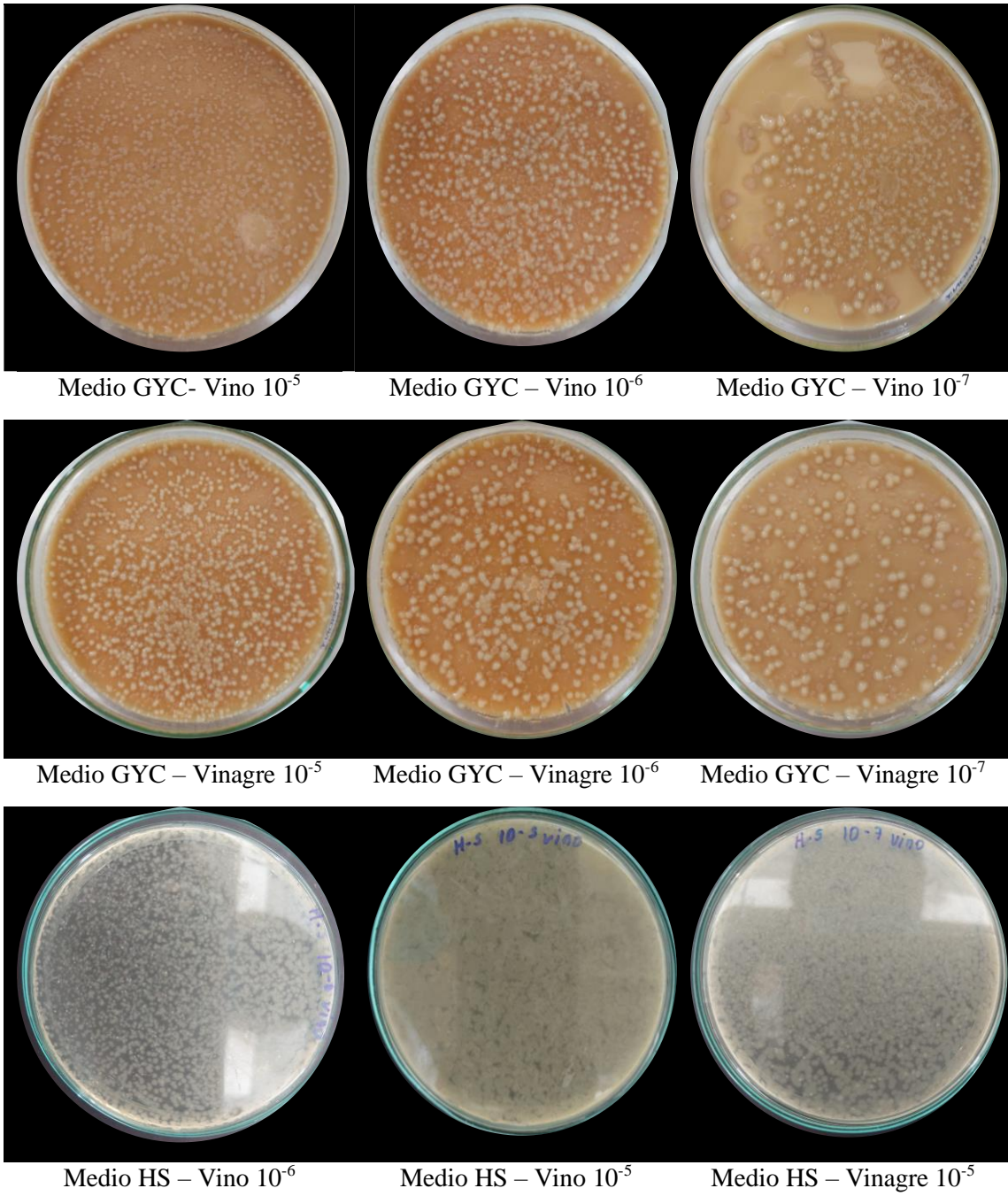
- industry. *Food Control*, 22(5), 647–656.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>
- Sharafi, S. M., Rasooli, I., & Beheshti-Maal, K. (2010). Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 41–48.
- Shen, L., Haufe, J., & Patel, M. K. (2009). Product overview and market projection of emerging bio-based plastics PRO-BIP 2009 Utrecht The Netherlands. *European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) and European Bioplastics*, June, 243 pp.
www.chem.uu.nl/nwswww.copernicus.uu.nl/commissionedbyEuropeanPolysaccharideNetworkofExcellence%0Awww.europeanbioplastics.org
- Shuller, G., Hertel, C., & Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2013–2020.
- Singh, R., Gautam, S., Sharma, B., Jain, P., & Chauhan, K. D. (2021). Biopolymers and their classifications. In *Biopolymers and their Industrial Applications*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819240-5.00002-x>
- Singhsa, P., Narain, R., & Manuspiya, H. (2018). Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose*, 25(3), 1571–1581.
<https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>
- Smith, A. M., Moxon, S., & Morris, G. A. (2016). Biopolymers as wound healing materials. In *Wound Healing Biomaterials* (Vol. 2). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00013-1>
- Tanskul, S., Amornthatree, K., & Jaturonlak, N. (2013). A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 421–428.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.017>
- Tashiro, K., & Kobayashi, M. (1991). Theoretical evaluation of three-dimensional elastic constants of native and regenerated celluloses: role of hydrogen bonds. *Polymer*, 32(8), 1516–1526. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(91\)90435-L](https://doi.org/10.1016/0032-3861(91)90435-L)

- Tokoh, C., Takabe, K., Fujita, M., & Saiki, H. (1998). Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. *Cellulose*, 5(4), 249–261. <https://doi.org/10.1023/A:1009211927183>
- Toscano Ávila, J. A., Terán, D. A., Debut, A., Vizuete, K., Martínez, J., & Cerda-Mejía, L. A. (2020). Shelf life estimation of Blackberry (*Rubus glaucus Benth*) with bacterial cellulose film coating from *Komagataeibacter xylinus*. *Food Science and Nutrition*, 8(4), 2173–2179. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1525>
- Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., & Yoshinaga, F. (1995). Screening of Bacterial Cellulose-producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1498–1502. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1498>
- Treviño, M. Z., Guerrero, A. S., González, R. A., García, C., Guzmán, A., Báez, J. G., & Márquez, J. M. (2020). Production of microbial cellulose films from green tea (*Camellia sinensis*) kombucha with various carbon sources. *Coatings*, 10(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/coatings10111132>
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V., & Koutinas, A. (2015). Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>
- Ullah, H., Santos, H. A., & Khan, T. (2016). Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*, 23(4), 2291–2314. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y>
- Van Zyl, E. M., & Coburn, J. M. (2019). Hierarchical structure of bacterial-derived cellulose and its impact on biomedical applications. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 24, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.04.005>
- Vegas, C., González, Á., Mateo, E., Mas, A., Poblet, M., & Torija, M. J. (2013). Evaluation of representativity of the acetic acid bacteria species identified by culture-dependent method during a traditional wine vinegar production. *FRIN*, 51(1), 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.055>
- Villarreal, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*,

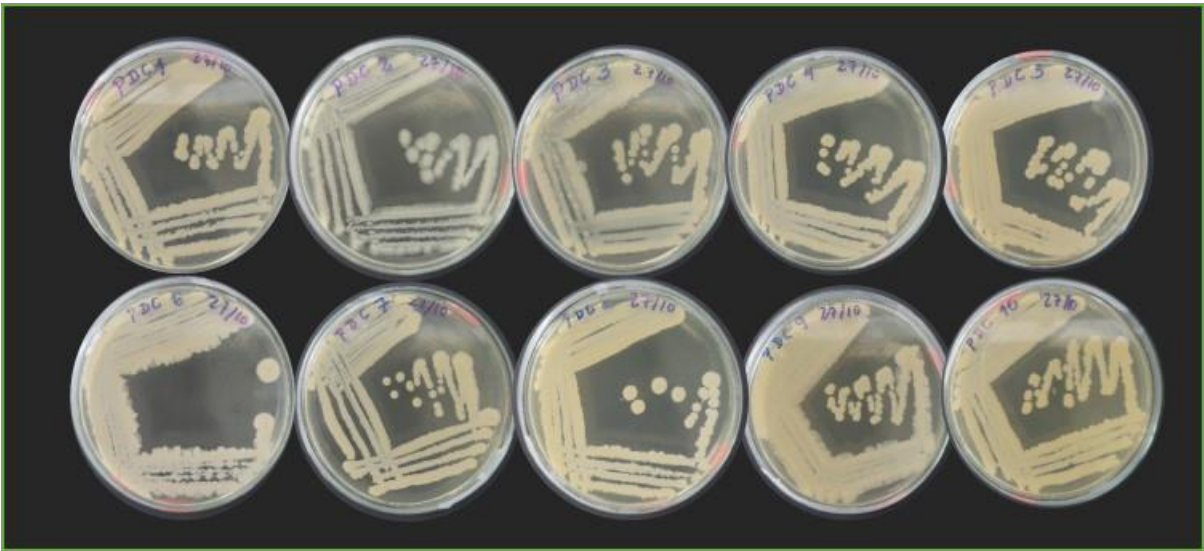
- 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Volova, T. G., Prudnikova, S. V., Sukovaty, A. G., & Shishatskaya, E. I. (2018). Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7417–7428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9198-8>
- Wankhade, V. (2020). Animal-derived biopolymers in food and biomedical technology. In *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00006-0>
- Wu, S. C., & Lia, Y. K. (2008). Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54(3–4), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.12.021>
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>
- Yetiman, A. E., & Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.013>
- 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>
- Zuluaga, R., Castro, C., Cleenwerck, I., Trc, J., Vos, P. De, Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J., & Gan, P. (2013). *cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar*. 1119–1125. <https://doi.org/10.1099/ijfs.0.043414-0>

ANEXOS

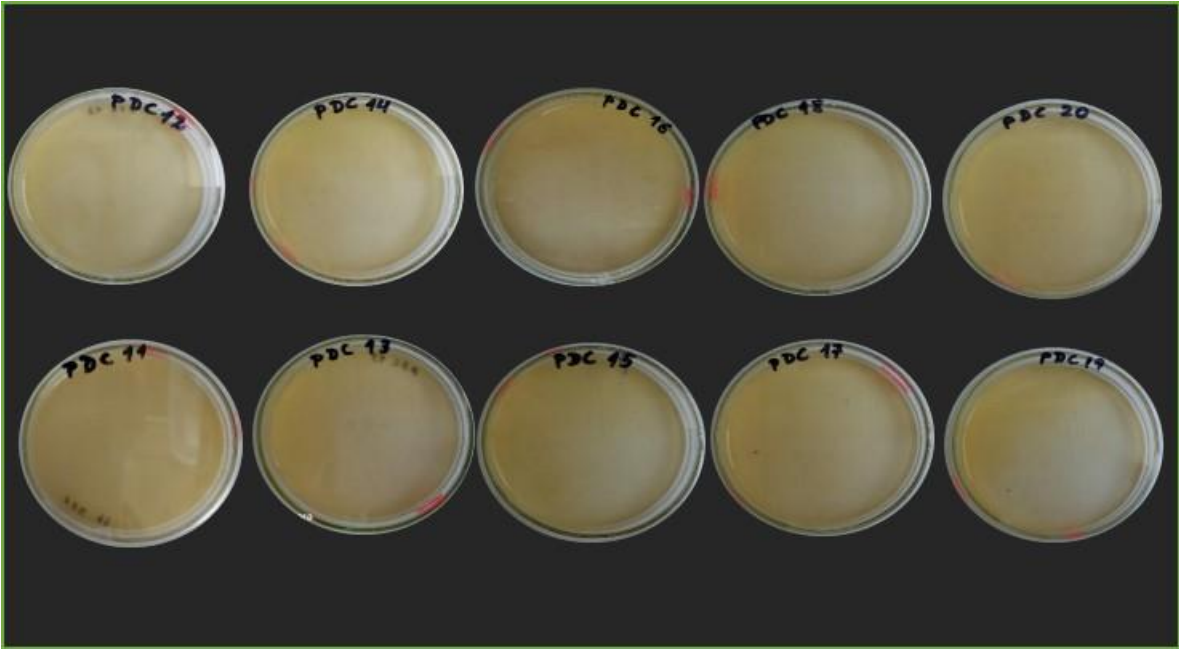
Anexo 1. Aislamiento de cepas nativas de *K. xylinus* a partir de vino y vinagre de vino en medios H-S y GYC agar



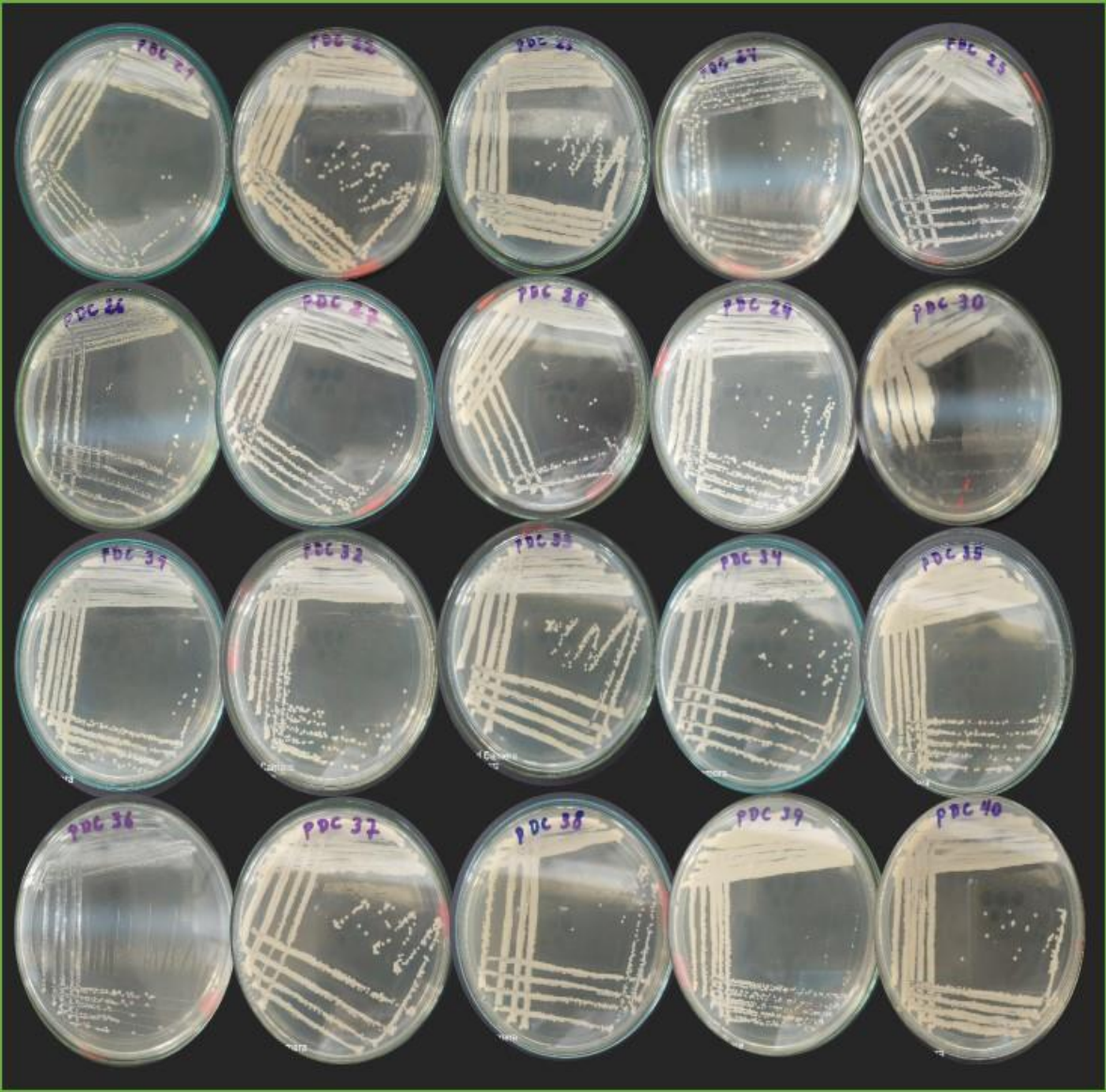
Anexo 2. *Aislamiento de cepas de las muestras de vino y vinagre de vino en medio HS agar*



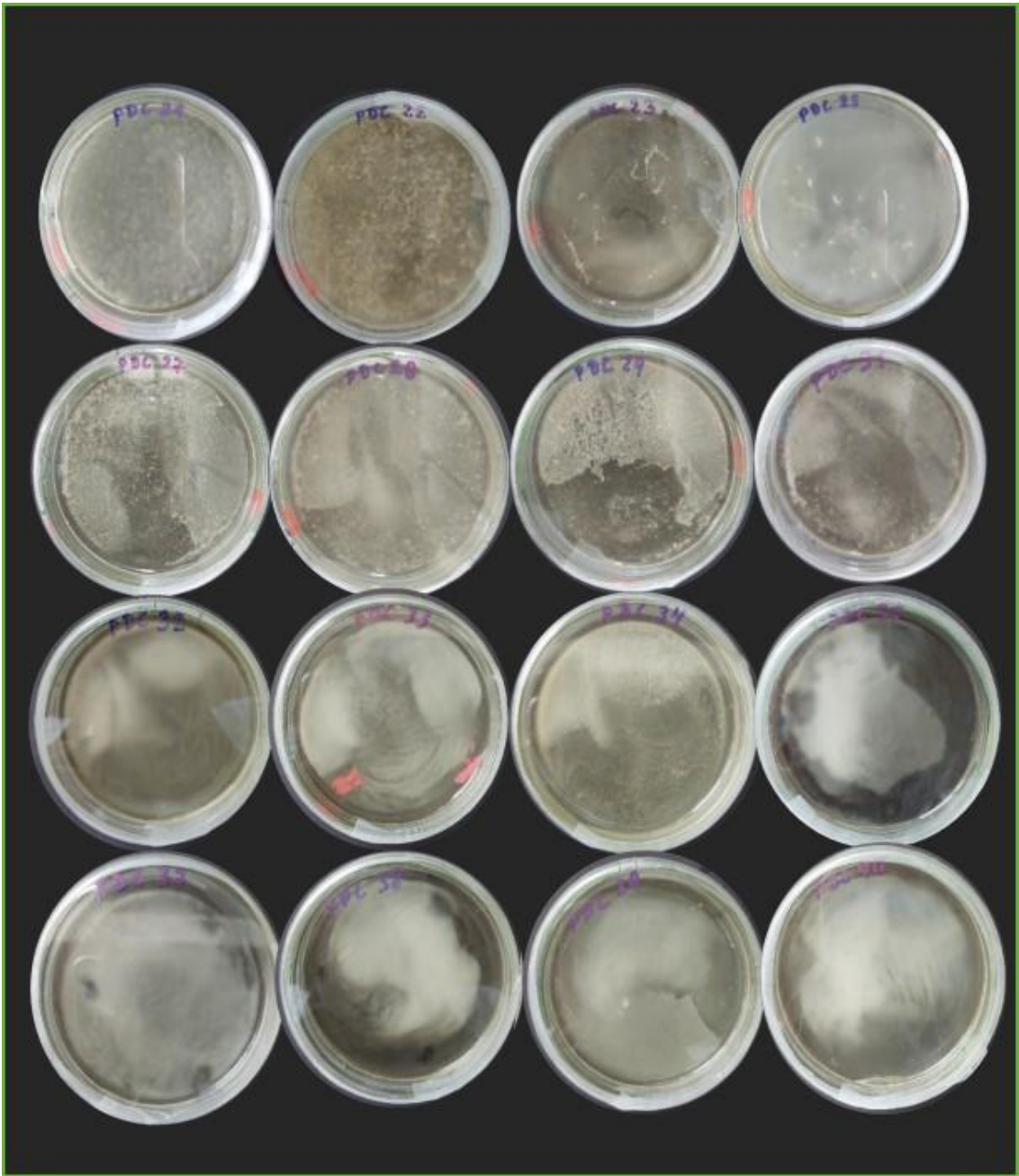
Anexo 3. *Pruebas de producción de CB en medio H-S con cepas aisladas de vino y vinagre*



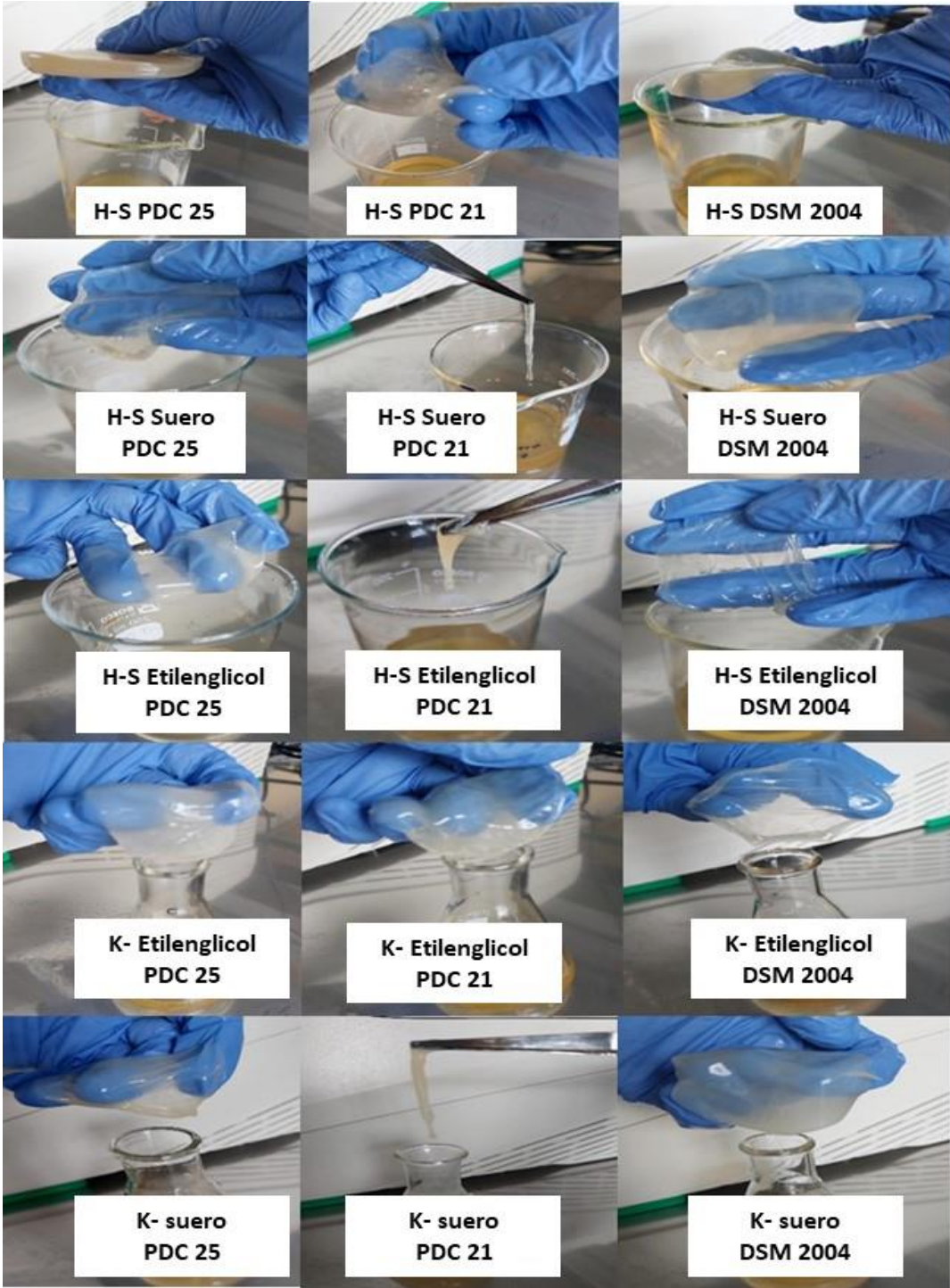
Anexo 4 Aislamiento de cepas nativas de *K. xylinus* a partir de SCOBY de kombucha



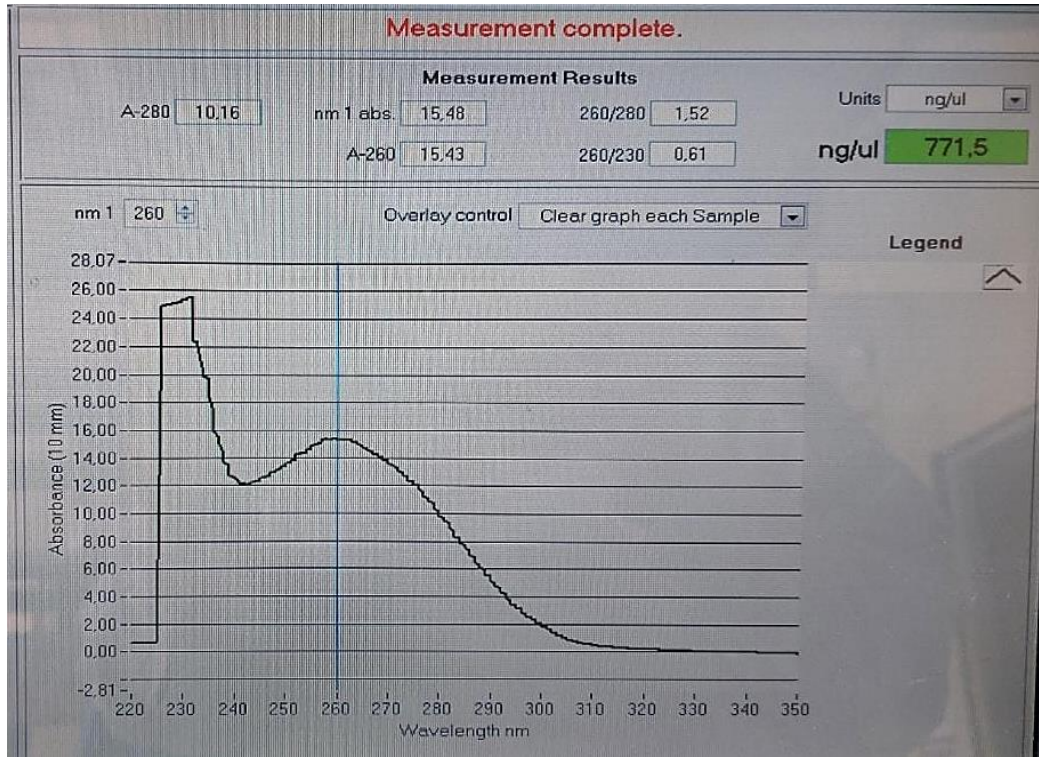
Anexo 5. Pruebas de producción de CB en medio H-S con las cepas aisladas de SCOBY de kombucha



Anexo 6. *Obtención de biofilms de las cepas PDC 21, PDC 25 y DSM 2004 en los diferentes medios de cultivo*



Anexo 7. Cuantificación de ADN genómico de la cepa PDC 21



Anexo 8. Cuantificación de ADN genómico de la cepa PDC 25

