



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



Análisis filogenético de *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 para la
producción de biofilms a partir de suero lácteo.

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

Autora: Evelyn Karina Balseca Mora
Tutora: Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

Ambato – Ecuador
Enero 2021

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 responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 11 de diciembre del 2020

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Evelyn Karina Balseca Mora, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Evelyn Karina Balseca Mora

C.I. 2300075864

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:

M.Sc. Liliana Patricia Acurio Arcos
C.I.1804067088
Presidente del tribunal

Dr. David Andrés Terán Mera
C.I. 1716569726

M.Sc. Diego Manolo Salazar Garcés
C.I. 1803124294

Ambato, 5 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un 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.



Evelyn Karina Balseca Mora

C.I. 2300075864

AUTORA

DEDICATORIA

*A mi abuelita Delfina, la luz de mi vida, quién inculcó
en este ser el amor por lo divino: Dios.*

*A mis padres Sandra y Milton, por su amor
incondicional, por brindarme apoyo en todas mis
decisiones y enseñarme que con perseverancia podría
lograr lo que me propusiera.*

*A mi hermano Rob, mi inspiración y fortaleza. Siempre
en mi corazón.*

AGRADECIMIENTO

A mi maravillosa familia, por el amor y la confianza, por demostrarme que la distancia no limita sentimientos y que esté donde esté siempre tendré su apoyo. Los amo.

A Daniela, por su cariño y amistad incondicional desde el primer día que ingresamos a la Universidad, por protegerme y ser mi hogar en esta ciudad.

A mi querida tutora la Dra. Liliana Cerda por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de titulación bajo su dirección, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su conocimiento.

A María, Salvatore, Giulio, Simona y Paolo por su importante aporte al proyecto.

Y a todas las personas con quienes he compartido hermosos momentos e influenciaron positivamente en mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Biopolímeros.....	1
1.1.2 Celulosa Bacteriana.....	1
1.1.2.1 Biosíntesis	1
1.1.2.2 Técnicas de fermentación.....	2
1.1.2.2.1 Cultivo estático	2
1.1.2.2.2 Cultivo agitado.....	3
1.1.2.3 Aplicaciones en la industria alimentaria.....	3
1.1.3 <i>Komagataeibacter xylinus</i>	4
1.1.4 Matrices tratadas en el estudio	4
1.1.4.1 Suero lácteo	4

1.1.4.2	Ácido láctico.....	5
1.2	Objetivos	5
1.2.1	Objetivo General	5
1.2.2	Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO II		6
METODOLOGÍA		6
2.1	Materiales, reactivos y equipos	6
2.1.1	Materiales	6
2.1.2	Reactivos	7
2.1.3	Equipos.....	7
2.1.4	Material biológico	7
2.2	Métodos	8
2.2.1	Comparación del genoma de especies <i>Komagataeibacter</i>	8
2.2.2	Construcción del árbol filogenético	8
2.2.3	Reproducción de la cepa en medio líquido	8
2.2.4	Medio empleado para la obtención de biofilm.....	8
2.2.5	Obtención de biofilm.....	9
CAPÍTULO III		10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		10
3.1	Análisis comparativo de especies de <i>Komagataeibacter</i>	10
3.2	Análisis filogenético	11
3.3	Efectividad en la producción de biofilm	18
CAPÍTULO IV		20
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		20
4.1.	Conclusiones	20
4.2.	Recomendaciones	20
BIBLIOGRAFÍA		21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana.....	2
Figura 2. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de <i>K. xylinus</i> K2G30 y otras cepas.....	12
Figura 3. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación de <i>K. xylinus</i> K2G30 y otras cepas.	13
Figura 4. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de <i>Komagataeibacter</i> y <i>E. coli</i> U 5/41.	15
Figura 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de <i>Komagataeibacter</i> y <i>E. coli</i> U 5/41	16
Figura 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la similitud entre <i>K. xylinus</i> k.x1 y <i>E. coli</i> U 5/41	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo H-S.....	9
Tabla 2. Componentes del medio con sustitución total de glucosa.....	9
Tabla 3. Microorganismos utilizados en la detección del operón lac	10

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de las especies de <i>Komagataeibacter</i> utilizadas en el estudio	26
Anexo 2. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de <i>K. xylinus</i> K2G30 y otras cepas.	31
Anexo 3. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de <i>K. xylinus</i> K2G30 y otras cepas	32
Anexo 4. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) Bootstrap basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de <i>Komagataeibacter</i> y <i>E. coli</i> U 5/41	33
Anexo 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de <i>Komagataeibacter</i> y <i>E. coli</i> U 5/41	34
Anexo 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias ARNr 16S que muestra la similitud entre <i>K. xylinus</i> k.x1 y <i>E. coli</i> U 5/41	35
Anexo 7. Medios H-S con sustitución total de glucosa	35
Anexo 8. Biofilms en medio H-S con sustitución de total de glucosa por ácido láctico.....	35

RESUMEN

La celulosa bacteriana al ser un biopolímero orgánico, renovable y biodegradable ha recibido una atención considerable. Aquí, se estudió producción de celulosa bacteriana (CB) por *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (UMCC 2756) en cultivo estático utilizando medio Hestrin y Schramm (HS) con sustitución total de glucosa por suero lácteo y ácido láctico. Además, se elaboraron árboles filogenéticos a partir de secuencias del gen ARN ribosomal 16S de especies *K. xylinus*, *K. europaeus*, *K. hansenii* y *K. intermedius*, los cuales revelaron que carecían del operón *lac* responsable de la hidrólisis de la lactosa. Debido a estas características pueden explicar que la producción de CB más alta por la cepa *K. xylinus* K2G30 se logró con el uso de ácido láctico como fuente única de carbono. Los resultados proporcionan información importante para posteriores estudios sobre la síntesis de CB a partir de diferentes fuentes de carbono, incluidas las materias primas de desechos industriales como el suero lácteo, el mismo que debería ser previamente fermentado para una mejor asimilación.

Palabras claves sugeridas:

Filogenia, biopolímero, suero lácteo, *Komagataeibacter xylinus*, celulosa bacteriana

ABSTRACT

Bacterial cellulose, being an organic, renewable and biodegradable biopolymer has received considerable attention. Here, the production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (UMCC 2756) was studied in static culture using Hestrin and Schramm (HS) medium with total replacement of glucose by whey and lactic acid. Furthermore, phylogenetic trees were made from sequences of the 16S ribosomal RNA gene from the species *K. xylinus*, *K. europaeus*, *K. hansenii* and *K. intermedius*, which revealed that they lacked the *lac* operon responsible for lactose hydrolysis. Due to these characteristics, they can explain that the highest production of BC by the *K. xylinus* K2G30 strain was achieved with the use of lactic acid as the sole carbon source. Results provide important information for future studies on the synthesis of BC from different carbon sources, including raw materials from industrial waste such as whey, which must be previously fermented for better assimilation.

Keywords:

Phylogeny, biopolymer, whey, *Komagataeibacter xylinus*, bacterial cellulose

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas que se sintetizan químicamente a partir de unidades monoméricas como azúcares, aminoácidos, grasas y aceites o son completamente biosintetizados por organismos vivos (**Smith, Moxon, & Morris, 2016**).

A lo largo de los años, la atención se ha centrado en el desarrollo de materiales respetuosos con el medio ambiente. Los biopolímeros al ser elaborados con materia prima biológica constituyen una contraparte efectiva a los plásticos de origen fósil (**Nitkiewicz et al., 2020**).

1.1.2 Celulosa Bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es un biopolímero extracelular sintetizado por bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina*, etc. A diferencia de la celulosa vegetal carece de lignina y hemicelulosa, pero sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y mecánicas son superiores ya que posee alta pureza, mayor capacidad de retención de agua, cristalinidad, resistencia mecánica y mejor moldeabilidad (**Islam, Ullah, Khan, Shah, & Park, 2017**).

1.1.2.1 Biosíntesis

La biosíntesis de CB consiste en un proceso complejo que involucra enzimas individuales, complejos catalíticos y proteínas reguladoras. La conversión de glucosa es catalizada por cuatro enzimas bacterianas: la glucoquinasa, responsable de la fosforilación del carbono 6 de la glucosa, produciendo glucosa-6-fosfato, la fosfoglucomutasa, que cataliza la reacción de isomerización de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, la UDPG-pirofosforilasa responsable de la síntesis de UDP-glucosa (UDPG) y la celulosa sintasa (CS), responsable de la polimerización de celulosa a partir de UDP-glucosa (Figura 1) (**Lustri et al., 2015**). Posteriormente, la síntesis de

celulosa ocurre cuando la glucosa se polimeriza en una cadena de β -1,4 glucano, ésta se combina con otras cadenas para formar la estructura de celulosa en forma de cinta, que sobresale de la célula como fibrillas tejidas a sí mismas (Reiniati, Hrymak, & Margaritis, 2017)

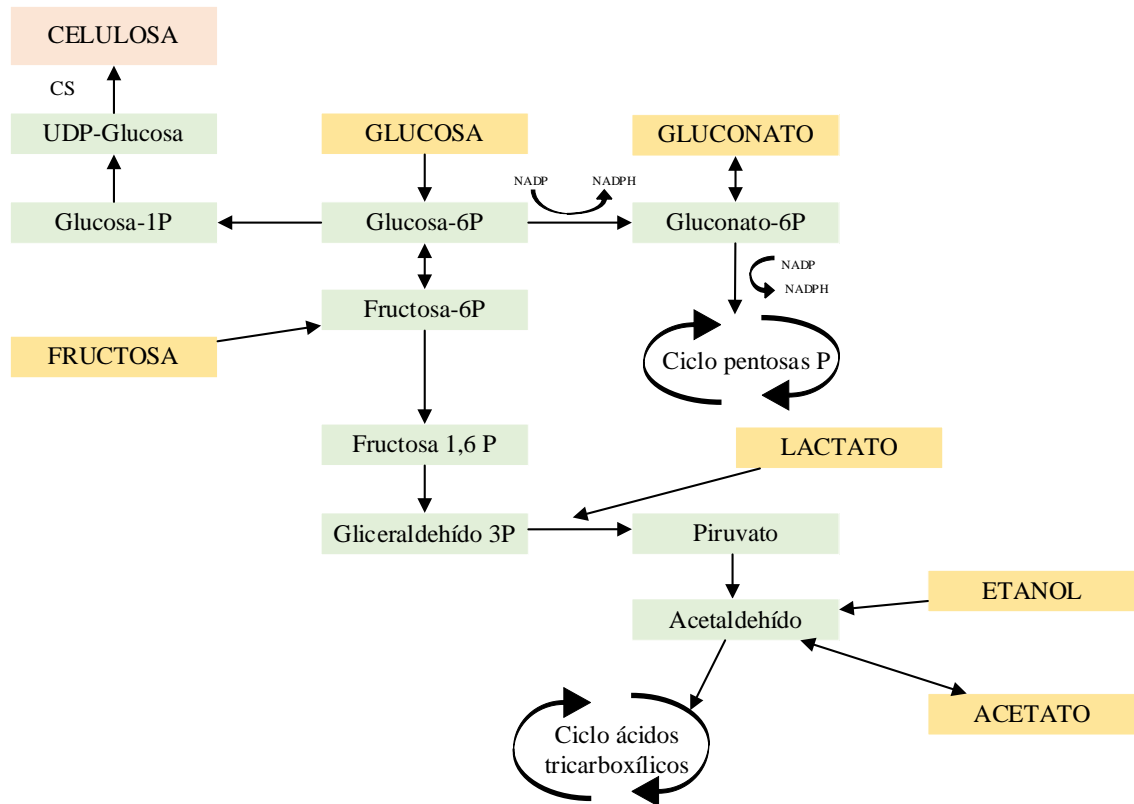


Figura 1. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana.

CS corresponde a la celulosa sintasa

1.1.2.2 Técnicas de fermentación

1.1.2.2.1 Cultivo estático

Es el método más utilizado para la producción de celulosa bacteriana. Consiste en colocar el medio en frascos o bandejas poco profundas, inocular la bacteria y cultivar hasta observar una película gelatinosa que se forma en la interfaz de aire-líquido del cultivo en reposo (Lustri et al., 2015). La parte superior de la película tiene un aspecto opaco y firme, mientras que la parte inferior es transparente y suave. Además, la producción de CB es proporcional a la superficie del recipiente que la contiene (Hestrin & Schramm, 1954). El cultivo estático representa una forma costosa de

producción debido a que se requiere largos tiempos y una gran área superficial, lo cual dificulta su aplicación industrial (**Pineda, Caicedo, & Riascos, 2012**).

1.1.2.2 Cultivo agitado

En el cultivo agitado se utilizan biorreactores o matraces agitados para mejorar la transferencia de oxígeno mientras se mantiene la homogeneidad del cultivo. La celulosa bacteriana tiene forma de cuerpos macroscópicos, suspensiones fibrosas, pellets, esferas o aglomeraciones amorfas (**Hestrin & Schramm, 1954**). A pesar de ser una técnica con mira a escala industrial la baja productividad hace que no sea factible su escalamiento, esto se debe al crecimiento de células no productoras de celulosa bacteriana y la capacidad que tienen para convertir la glucosa en ácido glucónico y cetoglucónico disminuyendo así los nutrientes del medio (**Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012**).

1.1.2.3 Aplicaciones en la industria alimentaria

Vigentini et al., (2019) mencionan que la “Configuración de la producción de celulosa bacteriana del género *Komagataeibacter* y su uso en un producto de panadería sin gluten” donde utilizaron cinco fuentes de carbono y tres de nitrógeno para determinar la productividad de la celulosa, la retención de agua y la rehidratación. Además, concluyeron que *K. rhaeticus* LMG 22126T, era la cepa con mayor rendimiento en una formulación de pan sin gluten. Los resultados obtenidos de las mediciones de los parámetros tecnológicos en los ensayos de levadura y horneado de masas fueron prometedores para su implementación en posibles nuevos alimentos.

Toscano et al., (2020) realizaron un estudio sobre “Estimación de vida útil de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*” con el fin de mejorar las características fisicoquímicas y microbiológicas. Obteniendo buenos resultados ya que el recubrimiento proporcionó protección física y biológica al fruto durante la postcosecha. Las moras con recubrimiento de celulosa bacteriana a 4°C extendieron su vida útil a 9 días y conservaron sus características iniciales.

Oliveira- Alcântara et al., (2020) realizaron un estudio donde se usó una mezcla de celulosa bacteriana/goma de anacardo como matriz polimérica para películas comestibles con probiótico *Bacillus coagulans*. Las películas mostraron buenas propiedades de tracción, barrera y estabilidad de almacenamiento probablemente favorecida por la capacidad de formación de esporas de *B. coagulans* y el papel protector de CB. No produjeron ningún efecto citotóxico y se las puede aplicar como recubrimientos o envoltorios a una variedad de alimentos, proporcionando beneficios potenciales para la salud de los consumidores, además de ser capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos de deterioro en la superficie de los alimentos, aumentando así la vida útil.

1.1.3 *Komagataeibacter xylinus*

También conocida anteriormente como *Gluconacetobacter xylinus* o *Acetobacter xylinum* es una bacteria Gran negativa aerobia, perteneciente a la familia de las acetobacterias. Produce niveles relativamente altos de CB a partir de una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno lo que la ha convertido en un modelo para estudios de producción de celulosa (**Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009**).

1.1.4 Matrices tratadas en el estudio

1.1.4.1 Suero lácteo

El suero lácteo se define como el líquido que se libera durante la elaboración del queso después de separar y coagular las caseínas (**Yadav et al., 2015**). Su alto valor biológico se atribuye al contenido de proteínas (principalmente albúminas y globulinas), aminoácidos, vitaminas (B6 y B12), ácidos láctico y cítrico, y minerales como calcio, magnesio, fósforo, así como otros compuestos biológicamente activos menores (**Revin, Liyaskina, Nazarkina, Bogatyreva, & Shchankin, 2018**).

A pesar de ser considerado el contaminante más importante de la industria láctea debido a sus altas concentraciones de DBO ($>30 \text{ kg m}^{-3}$) y DQO ($>60 \text{ kg m}^{-3}$) (**Sampaio, de Faria, da Silva, de Souza Oliveira, & Converti, 2019**). El suero lácteo ha sido utilizado tradicionalmente en la alimentación de los cerdos, esparcido en tierras agrícolas como fertilizante o incluso vertido directamente a los ríos o al mar sin un tratamiento previo (**Božanić, Barukčić, Lisak Jakopović, & Tratnik, 2014**). Existen

varios enfoques modernos para su valorización, uno de ellos es la conversión bacteriana en un medio de fermentación barato para la producción de diversos polímeros, reduciendo así los problemas ambientales relacionados con su eliminación (Zotta, Solieri, Iacumin, Picozzi, & Gullo, 2020).

1.1.4.2 Ácido láctico

El ácido láctico (2-hidroxi-propanoico) es un compuesto químico que se produce mediante fermentación microbiana o síntesis química. El primer proceso es el más empleado y da como resultado isómeros ópticos; L (+) láctico o D (-) láctico. El ácido láctico L (+) es utilizado como aditivo alimentario mientras que el ácido láctico D (-) puede a veces resultar dañino para el organismo humano (Rojas, Montaña, & Bastidas, 2015).

Uno de los principales intereses de la industria es reducir costos en materias primas. Así, para la producción de ácido láctico se ha planteado utilizar recursos renovables y residuos agroindustriales entre los que se identifica al lactosuero, que por su significativo contenido de lactosa se ha convertido en un sustrato ideal para la fermentación bacteriana (Atiat, Nasr, Eman, & Olfat, 2019).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Analizar la filogenia de *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 para la producción de biofilms a partir de suero lácteo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar la presencia del operón *lacZ* en la cepa productora de celulosa *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756.
- Comparar las diferentes especies de *Komagataeibacter* según la secuencia del operón *lacZ* y 16S.
- Determinar la efectividad de la producción de biofilms a partir de suero lácteo.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales, reactivos y equipos

2.1.1 Materiales

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

2.1.2 Reactivos

- Extracto de levadura
- Peptona
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- Ácido Láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)
- 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)

2.1.3 Equipos

- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110)
- Agitador incubador orbital (Shaker mini-Benchmarle).
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- Incubadora (Isotherm).
- Refrigerador (LG)
- Potenciómetro (Thermo Scientific).
- Ultra congelador (Binder)
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIRR).
- Estufa (Precisión-Thermo Scientific)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Centrífuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen)
- Software MEGA X

2.1.4 Material biológico

Para la producción de biofilm se utilizó *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, adquirida de la colección DSMZ (Braunschweig, Alemania) y conservada en el Laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en un cultivo líquido con 20% de glicerol a -80°C .

2.2 Métodos

2.2.1 Comparación del genoma de especies *Komagataeibacter*

Se utilizaron genomas completos de diferentes especies de *Komagataeibacter*, que se encuentran ensamblados y anotados en la base de datos NCBI. En estos genomas se buscó la presencia del operón *lac* y sus respectivos genes estructurales: *lacZ*, *lacY* y *lacA*, para demostrar si las especies eran capaces de hidrolizar lactosa.

2.2.2 Construcción del árbol filogenético

Las secuencias de ARN ribosomal 16S de 68 cepas del género *Komagataeibacter* incluidas *K. xylinus*, *K. europaeus*, *K. hansenii* y *K. intermedius* se recuperaron de la base de datos de nucleótidos NCBI y se alinearon con ClustalW. A partir de la alineación se construyeron árboles filogenéticos en MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) con los métodos Neighbor-Joining y Máxima Verosimilitud utilizando el modelo Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969) con 1000 réplicas, configurando la opción de distribución gamma.

2.2.3 Reproducción de la cepa en medio líquido

Los inóculos de *Komagataeibacter xylinus* K2G30 se obtuvieron a partir de re-suspensiones. Se incubó a 30°C por 48 horas en medio H-S líquido. Posteriormente se llevó al vórtex durante dos minutos para soltar las bacterias del biofilm.

2.2.4 Medio empleado para la obtención de biofilm

Se utilizó la metodología H-S, propuesta por (Hestrin & Schramm, 1954). En la Tabla 1 se detallan los componentes del medio de cultivo H-S estándar en la producción de celulosa bacteriana, mientras que en la Tabla 2 se observa la sustitución total de glucosa por suero lácteo y ácido láctico.

Tabla 1. 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)

Tabla 2. Componentes del medio con sustitución total de glucosa

Componentes sustitutivos		g/L	pH
Suero lácteo	Ácido láctico/Suero lácteo	20	
Peptona	Peptona	5	6
Extracto de levadura	Extracto de levadura	5	
Fosfato disódico	Fosfato disódico	2.7	
Ácido cítrico	Ácido cítrico	1.15	

2.2.5 Obtención de biofilm

Se realizaron ensayos por triplicado en matraces erlenmeyer estériles de 250mL, que contenían 1 mL de inóculo y 50 mL de medio H-S líquido estándar y medio modificado. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 15 días en condiciones estáticas (Gullo et al., 2017).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis comparativo de especies de *Komagataeibacter*

Los genomas completos de cuatro especies de *Komagataeibacter* que se identificaron mediante una búsqueda en las bases de datos NCBI y GenBank (Tabla 3), demostraron la ausencia del operón *lac* y sus genes estructurales *lacZ*, *lacY* y *lacA*. El gen *lacZ* es el responsable de que la enzima β -galactosidasa hidrolice la lactosa en monómeros de glucosa y galactosa (Kolesovs & Semjonovs, 2020).

Tabla 3. Microorganismos utilizados en la detección del operón *lac*

Microorganismo	Número de acceso NCBI
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain CGMCC 2955	CP024644.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain CGMCC 17276	CP041348.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain SRCM101446	CP021467.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain C110	CP062147.1

Las especies de *Komagataeibacter* son conocidas por ser grandes productoras de celulosa bacteriana. Se ha descubierto que las cepas de *K. hansenii* son productoras eficientes de celulosa de forma pura sintetizada mediante un proceso de autoensamblaje jerárquico dirigido por células (Pfeffer, Santos, Ebels, Bordbar, & Brown, 2017). Mientras que, *K. europaeus* posee una fuerte capacidad para oxidar etanol en comparación con otras especies de bacterias del ácido acético (BAA) y está asociada a la producción de vinagre en sistema sumergido (Valera et al., 2015).

La producción de celulosa no solo depende de la cepa, sino también de los ingredientes del medio y de las condiciones de cultivo para lograr la máxima producción (Rangaswamy, K P, & Hungund, 2015). Según la literatura, no se espera que los disacáridos como la lactosa produzcan un alto rendimiento de celulosa, pero los monosacáridos como la fructosa son muy buenas fuentes de carbono (Mohammadkazemi, Doosthoseini, & Azin, 2015). Una de las formas en las que las

BAA pueden utilizar sacarosa y lactosa para producir CB es la presencia de enzimas como las invertasas y la lactasa (**Hungund et al., 2013**).

3.2 Análisis filogenético

El análisis filogenético de ARN ribosomal 16S mostró que las cepas *K. xylinus*, *K. europaeus*, *K. hansenii* y *K. intermedius* son mucho más similares entre sí. Sin embargo, existe una divergencia con la secuencia de *K. xylinus* k.x1. Si bien una secuencia del genoma solo brinda información sobre el contenido genético de una célula, los estudios que involucran la investigación de patrones de expresión génica brindan una idea y profundizan la comprensión de las funciones de los genes (**M. Ryngajłło, Jędrzejczak-Krzepkowska, Kubiak, Ludwicka, & Bielecki, 2020**).

El ARNr 16S al proceder de subunidades pequeñas de los ribosomas, las cuales se encuentran altamente conservadas, presenta regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El empleo de la secuenciación de ARNr 16S fue particularmente útil para obtener información filogenética y taxonómica de las cepas involucradas (**Valenzuela, Casillas, Villalpando, & Vargas, 2015**).

El árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en el gen de ARN ribosomal 16S de la Figura 2, muestra la diversificación de las cepas de *Komagataeibacter* en dos grandes grupos. Debido al principio de evolución mínima del método no se examinan todas las topologías posibles, minimizando así la suma de las longitudes de las ramas en cada etapa del agrupamiento (**Saitou & Nei, 1987**).

La especie *K. xylinus* K2G30 se encontró en el primer subgrupo y está estrechamente relacionada con *K. xylinus* NBRC 15237 y *K. xylinus* ZUSTBC001. Esto concuerda con estudios anteriores de **Gullo et al. (2019)** donde se representaron genomas secuenciados de *Komagataeibacter* en los que se agrupa K2G30 con la cepa de tipo *K.xylinus* NBRC 15237 indicando que puede atribuirse con seguridad a esta especie.

El árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (Figura 3) dio resultados similares en cuanto a la posición de la cepa K2G30, este método estadístico es más exacto ya que da la varianza más pequeña de estimación de parámetro cuando el tamaño de la población de la muestra es grande (**Nei & Kumar, 2000**).

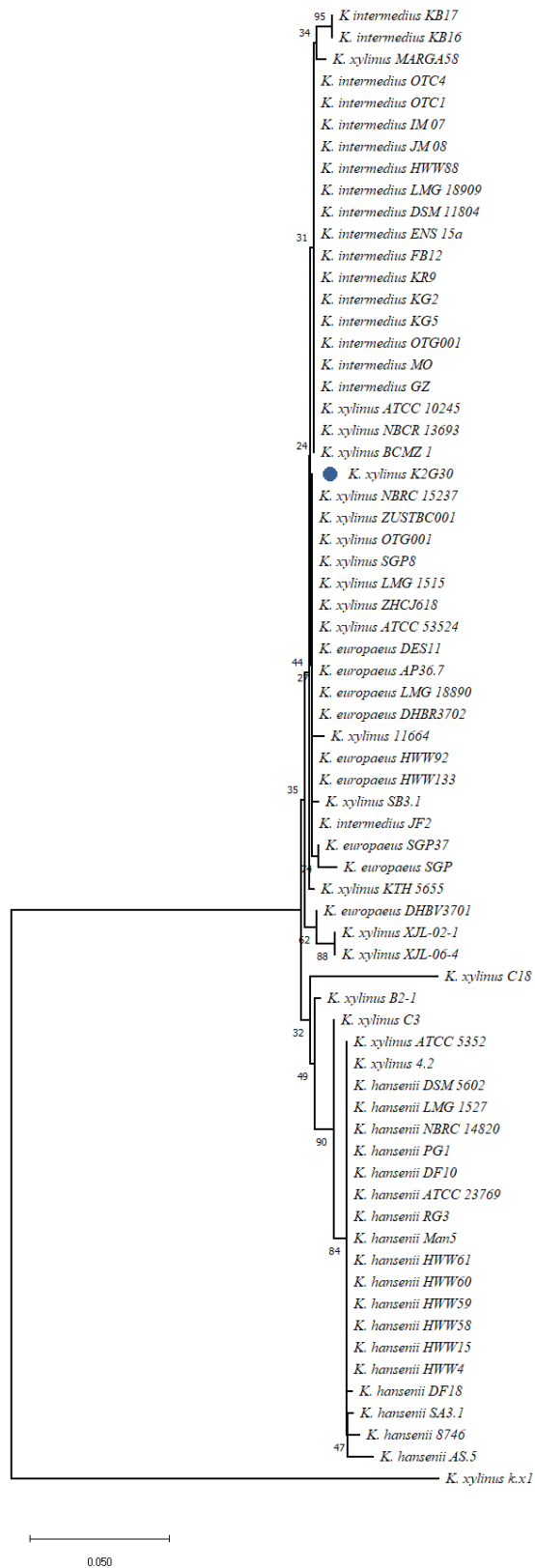


Figura 2. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de *K. xylinus* K2G30 y otras cepas.

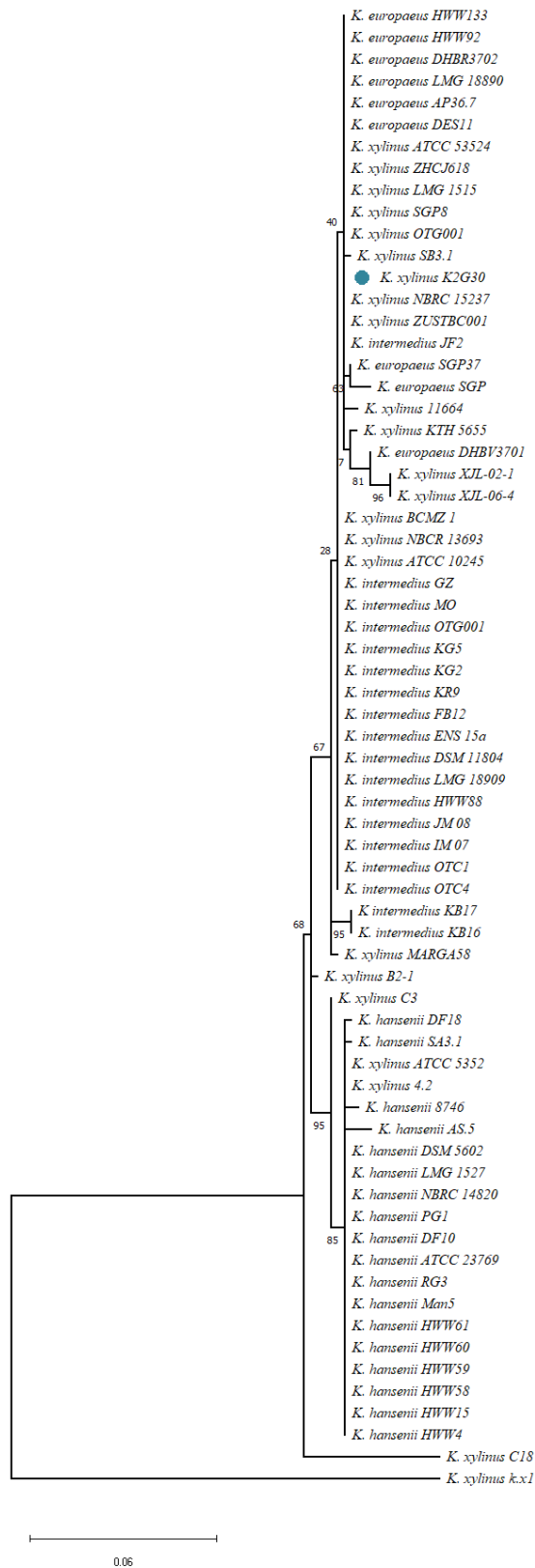


Figura 3. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación de *K. xylinus* K2G30 y otras cepas.

Para confirmar la ausencia del operón *lac* se realizó una comparación de las secuencias de ARN ribosomal 16S, entre las especies de *Komagataeibacter* y *E. coli*. Se utilizó *E.coli* como modelo debido a que contiene el operón *lac* y los genes involucrados en el metabolismo de la lactosa (Nepal et al., 2019).

La filogenia mostró que la mayor parte de bacterias se encontraban agrupadas en clados de su misma especie con algunas excepciones como se observa en la Figura 5 que corresponde al árbol de Máxima Verosimilitud el cual está respaldado por una topología similar del árbol de Neighbor-Joining (Figura 4). La confiabilidad de las agrupaciones obtenidas se evaluó mediante la prueba de bootstrap con 1,000 replicaciones y se aplicó el modelo de corrección Jukes-Cantor, donde se asume que las cuatro bases nucleótidas tienen la misma frecuencia y todas las sustituciones son igualmente probables (Jukes & Cantor, 1969).

En general, algunas especies de *K. xylinus* tienen una relación más cercana con *K. europaeus* y *K. intermedius* que con *K. hansenii*.

Škraban et al. (2018) informaron el aislamiento de dos cepas de *Komagataeibacter* T5K1 y AV446 de vinagres de sidra de manzana durante la producción de vinagre sumergido industrial, en este estudio se observan árboles filogenéticos en los que *K. europaeus* LMG 18890 y *K. xylinus* LMG 1515 se encuentran agrupadas en un mismo cluster.

Ryngajlo et al. (2019) realizaron un estudio comparativo de diecinueve genomas de *Komagataeibacter* donde encontraron rasgos genómicos que probablemente contribuyan a la diversidad fenotípica entre las cepas. También proporcionando evidencia genética para la distinción entre los dos clados principales, *K. xylinus* y *K. hansenii*.

Jang et al. (2019) realizaron en su estudio un análisis filogenético de *K. xylinus* DSM 2325 y otras especies relacionadas dentro de la familia *Acetobacteraceae* utilizando el gen de secuencias de ARNr 16S, revelando así que la cepa DSM 2325 pertenecía efectivamente al género *Komagataeibacter* y mantenía la mayor distancia genética con *K. hansenii* ATCC 23769.

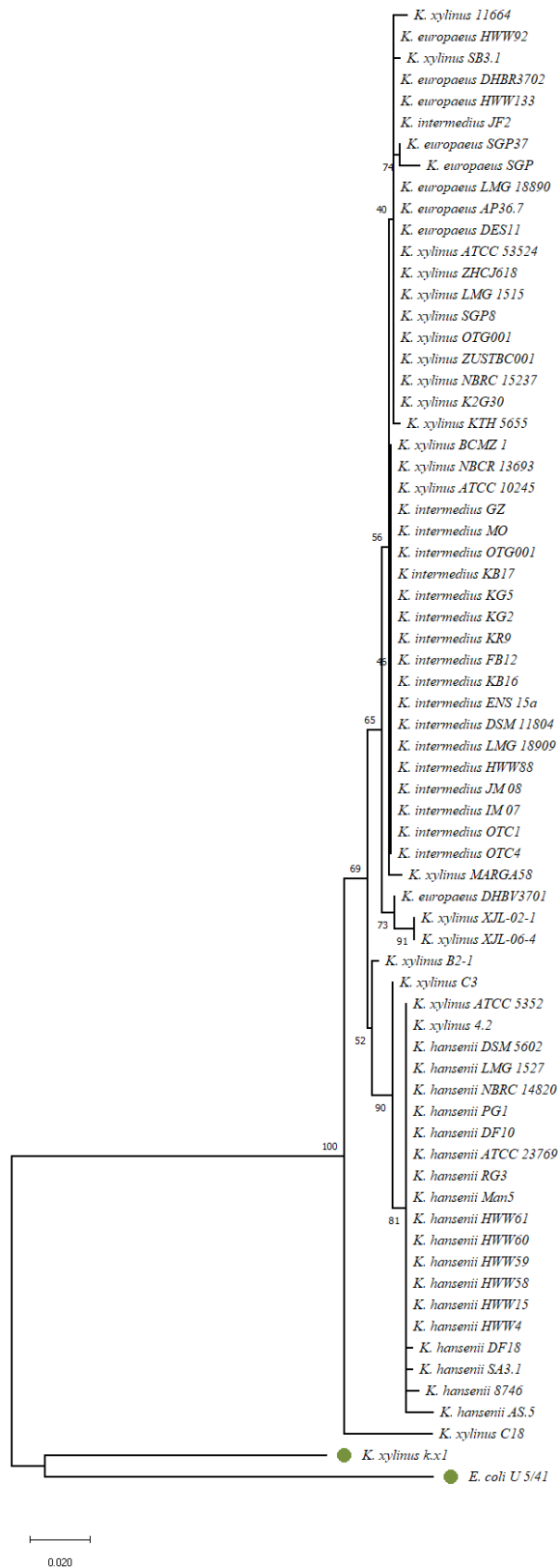


Figura 4. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de *Komagataeibacter* y *E. coli* U 5/41.

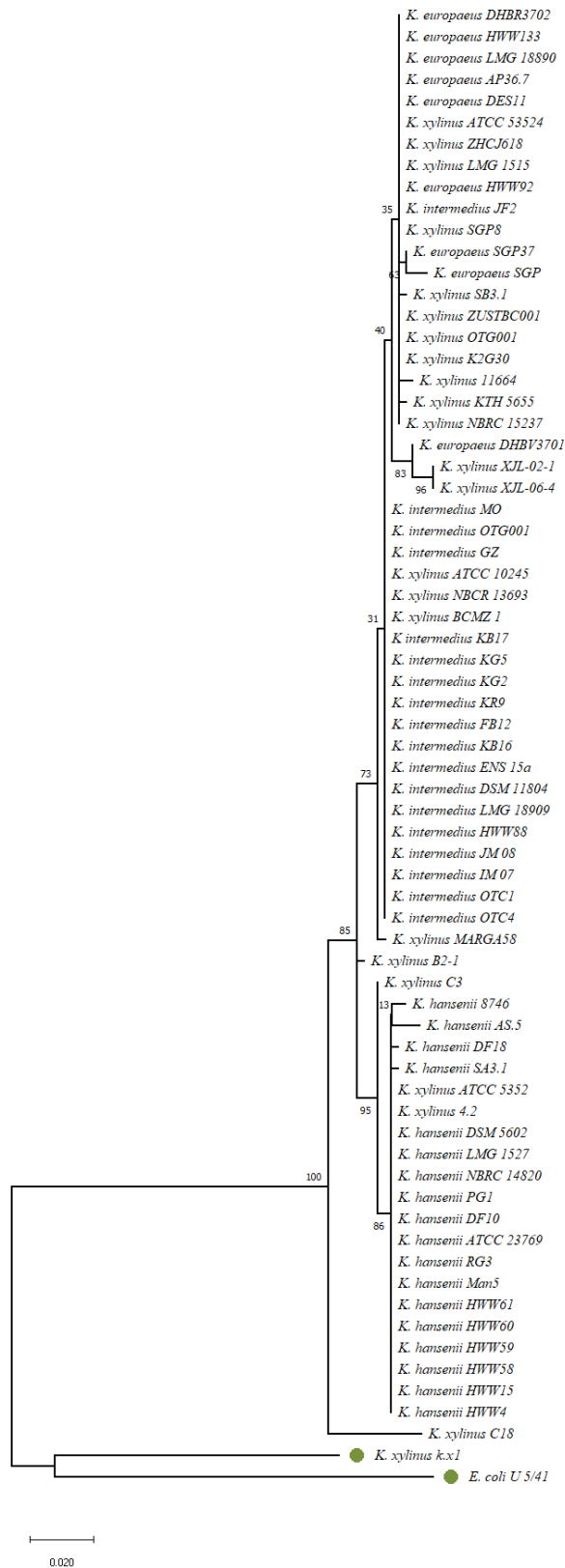


Figura 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de *Komagataeibacter* y *E. coli* U 5/41

La topología del árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (Figura 6), construido con seis especies de *Komagataeibacter* y en el que se aplicó el método Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), reveló que *K.xylinus* k.x1 es la cepa que más se relaciona con *E.coli* U 5/41.

Lavasani et al. (2017) en la investigación genómica de *K. xylinus* k.x1 aislada de vinagre tradicional iraní, describen una diversidad notable en subunidades de operones, secuencias de genes e incluso productos. Esta bacteria puede producir celulosa bacteriana y dio un resultado positivo a catalasa. Sin embargo, no existen estudios suficientes para determinar su estrecha relación con *E. coli*.

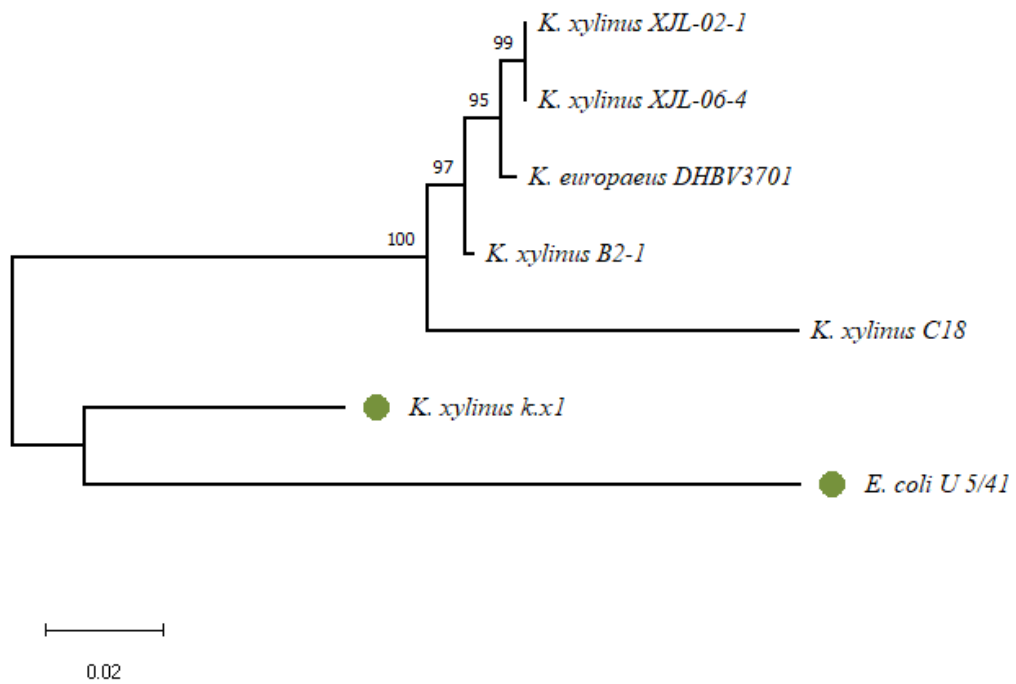


Figura 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en secuencias ARNr 16S que muestra la similitud entre *K. xylinus* k.x1 y *E. coli* U 5/41

3.3 Efectividad en la producción de biofilm

En la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* K2G30 se utilizó suero lácteo y ácido láctico, como fuentes de carbono alternativas a la glucosa, mediante un sistema de cultivo estático a 30°C durante 15 días. Las películas de CB fueron visibles a partir del día 4. El medio que contenía suero lácteo mostró una película frágil debido a que la fuente principal del suero es lactosa, disacárido incapaz de ser hidrolizado por la cepa K2G30.

Los sustratos alternativos en la producción de CB pueden causar cambios en su microestructura, afectando las propiedades físicas y mecánicas (índice de cristalinidad, grado de polimerización, peso molecular, capacidad de retención de agua, tasa de transmisión de oxígeno y agua) (Singhsa, Narain, & Manuspiya, 2018). El uso de suero lácteo como medio alternativo disminuyó la cristalinidad de la CB del 80 al 50% (Revin et al., 2018).

Otro problema que puede atribuirse es la hidrólisis débil de las proteínas del suero. Es decir, que la actividad de la proteasa no es suficiente para permitir que las acetobacterias (BAA) obtengan todas las sustancias de crecimiento requeridas del suero. Lo que restringe la producción de CB (Kolesovs & Semjonovs, 2020). Las BAA normalmente utilizan glucosa para un mayor metabolismo, dejando la galactosa sin asimilar (Mamlouk & Gullo, 2013).

Se han publicado pocos estudios que han tenido como objetivo evaluar el suero como sustrato en la producción de CB.

Tsouko et al. (2015) demostraron que *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 no metabolizaba eficazmente la lactosa. Las bacterias podían producir solo 1,6 g/L de CB al crecer en lactosa, esto puede ser atribuido a que los miembros de la familia *Acetobacteraceae*, a la que pertenece *K. xylinus*, no poseen el gen que codifica la β -galactosidasa.

Jozala et al. (2015) demostraron que *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 en medio que contenía suero dio como resultado un rendimiento de CB menor (25 mg/mL) en comparación con el medio estándar HS (30,8 mg/mL). Lo que indica que la bacteria preferiblemente metaboliza monosacáridos tales como fructosa y glucosa.

Carreira et al. (2011) demostraron bajos niveles de producción de CB por *Gluconacetobacter sacchari* aislado de té de Kombucha en medio H-S modificado por reemplazo de glucosa con lactosa (0,31 g/L) y medio de suero lácteo sin ningún suplemento adicional (0,08 g/L).

Los resultados obtenidos al sustituir la glucosa en el medio H-S por ácido láctico mostraron que la cepa K2G3O es capaz de producir una membrana gelatinosa compacta en la interfaz aire-líquido. La mayor parte de la producción de ácido láctico se realiza a partir de la fermentación de suero, debido a su alto contenido de lactosa (5-6 g/100 g) se considera una excelente materia prima para la obtención de celulosa bacteriana (**Božanić et al., 2014; Parashar, Jin, Mason, Chae, & Bressler, 2016**).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El análisis comparativo reveló que las especies de *Komagataeibacter* carecen del operón *lac* y sus genes estructurales, es decir, que no pueden hidrolizar lactosa. Esto justifica la baja producción de celulosa bacteriana por *K. xylinus* K2G30 en medio de suero lácteo.
- Se determinó que la especie *Komagataeibacter* está compuesta por cepas estrechamente relacionadas, la cepa K2G30 tiene un contenido genómico semejante a *K. xylinus* NBRC 15237 lo que presume un mismo rendimiento en cuanto a producción de CB.
- El análisis filogenético exhibió una divergencia entre las secuencias 16S con la especie *K. xylinus* k.x1, ya que posee alta similitud con *E. coli* U 5/41, infiriendo en que tiene o puede llegar a desarrollar el gen *lacZ*.
- La celulosa bacteriana producida por *K. xylinus* K2G30 (UMCC2756) para la obtención de biofilm se sintetizó con éxito utilizando ácido láctico como fuente de carbono alternativa en lugar de glucosa.

4.2. Recomendaciones

- Aplicar técnicas moleculares como la amplificación por PCR, para que los aislamientos de las cepas bacterianas se identifiquen con precisión.
- Fermentar el suero lácteo para poder utilizarlo como fuente de carbono en la producción de biofilm.
- Utilizar fuentes de carbono combinadas para una mayor producción de celulosa bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

- Atiat, D., Nasr, N., Eman, Y., & Olfat, B. (2019). Bio-Production of lactic acid from salted whey and whey permeate *Plant Archives*, *19*, 793-798.
- Božanić, R., Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., & Tratnik, L. (2014). Possibilities of Whey Utilisation. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, *2*.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, *102*(15), 7354-7360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>
- Carreño, L., Caicedo, L., & Martínez, C. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, *8*(16), 307-335.
- 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*, 58-58. doi: [10.3389/fmicb.2019.00058](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. *Appl Microbiol Biotechnol*, *101*(22), 8115-8127. doi: [10.1007/s00253-017-8539-3](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8539-3)
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, *58*(2), 345-352.
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V., & Gupta, S. G. (2013). Production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using dual and cheaper carbon sources. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, *5*, 31-33. doi: [10.4172/1948-5948.1000095](https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000095)
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int J Biol Macromol*, *102*, 1166-1173. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110)

- Jang, W. D., Kim, T. Y., & Kim, H. U. (2019). Genomic and metabolic analysis of *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 producing bacterial cellulose nanofiber. *116*(12), 3372-3381. doi: 10.1002/bit.27150
- Jozala, A. F., Pértile, R. A., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A., Jr. (2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Appl Microbiol Biotechnol*, *99*(3), 1181-1190. doi: 10.1007/s00253-014-6232-3
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In H. N. Munro (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism* (pp. 21-132): Academic Press.
- Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, *104*(18), 7723-7730. doi: 10.1007/s00253-020-10803-9
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, *35*(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lavasani, P. S., Motevaseli, E., Shirzad, M., & Modarressi, M. H. (2017). Isolation and identification of *Komagataeibacter xylinus* from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. *Iran J Microbiol*, *9*(6), 338-347. doi: 10.1007/s00253-017-8680-z
- Lustri, W. R., de Oliveira Barud, H. G., da Silva Barud, H., Peres, M. F., Gutierrez, J., Tercjak, A., . . . Ribeiro, S. J. L. (2015). Microbial Cellulose—Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications.
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian journal of microbiology*, *53*(4), 377-384. doi: 10.1007/s12088-013-0414-z
- Mohammadkazemi, F., Doosthoseini, K., & Azin, M. (2015). Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734). *Cellulose Chemistry and Technology*, *49*.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford university press.
- Nepal, M. R., Kang, M. J., Kim, G. H., Cha, D. H., Nam, D. H., & Jeong, T. C. (2019). Identification of pre- and pro-haptens with a β -galactosidase-expressing *E. coli*

- culture system for skin sensitization. *Toxicology Letters*, 305, 81-93. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.01.015
- Nitkiewicz, T., Wojnarowska, M., Sołtysik, M., Kaczmarski, A., Witko, T., Ingrao, C., & Guzik, M. (2020). How sustainable are biopolymers? Findings from a life cycle assessment of polyhydroxyalkanoate production from rapeseed-oil derivatives. *Science of The Total Environment*, 749, 141279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141279>
- Oliveira-Alcântara, A. V., Abreu, A. A. S., Gonçalves, C., Fuciños, P., Cerqueira, M. A., Gama, F. M. P., . . . Azeredo, H. M. C. (2020). Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT*, 130, 109699. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109699>
- Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1859-1867. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059>
- Pfeffer, S., Santos, R., Ebels, M., Bordbar, D., & Brown, R. M., Jr. (2017). Complete Genome Sequence of *Komagataeibacter hansenii* Strain SC-3B. *Genome announcements*, 5(15), e00169-00117. doi: 10.1128/genomeA.00169-17
- Pineda, L., Caicedo, L. M., & Riascos, C. (2012). Fermentation Techniques and Applications of Bacterial Cellulose: a Review. *Ingeniería y Ciencia*, 8, 307-335. doi: 10.17230/ingciencia.8.16.12
- Rangaswamy, B., K P, V., & Hungund, B. (2015). Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1-8. doi: 10.1155/2015/280784
- Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A. (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. *Crit Rev Biotechnol*, 37(4), 510-524. doi: 10.1080/07388551.2016.1189871
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012>

- Rojas, A. M., Montaña, L. P., & Bastidas, M. J. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44, 5-10.
- Ryngajłło, M., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Kubiak, K., Ludwicka, K., & Bielecki, S. (2020). Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(15), 6565-6585. doi: 10.1007/s00253-020-10671-3
- Ryngajłło, M., Kubiak, K., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Jacek, P., & Bielecki, S. (2019). Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains-Efficient bionanocellulose producers. *MicrobiologyOpen*, 8(5), e00731-e00731. doi: 10.1002/mbo3.731
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sampaio, F. C., de Faria, J. T., da Silva, M. F., de Souza Oliveira, R. P., & Converti, A. (2019). Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. *Environmental Technology*, 1-9.
- 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.
- Škraban, J., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Fanedl, L., & Trček, J. (2018). Genome sequences and description of novel exopolysaccharides producing species *Komagataeibacter pomaceti* sp. nov. and reclassification of *Komagataeibacter kombuchae* (Dutta and Gachhui 2007) Yamada et al., 2013 as a later heterotypic synonym of *Komagataeibacter hansenii* (Gosselé et al. 1983) Yamada et al., 2013. *Syst Appl Microbiol*, 41(6), 581-592. doi: 10.1016/j.syapm.2018.08.006
- Smith, A. M., Moxon, S., & Morris, G. A. (2016). 13 - Biopolymers as wound healing materials. In M. S. Ågren (Ed.), *Wound Healing Biomaterials* (pp. 261-287): Woodhead Publishing.

- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, *10*(3), 512-526.
- Toscano, J., Teran, D., Debut, A., Vizuite, K., Martínez, J., & Cerda-Mejía, L. (2020). Shelf life estimation of Blackberry (*Rubus glaucus Benth*) with bacterial cellulose film coating from *Komagataeibacter xylinus*. *Food Science & Nutrition*, *8*. doi: 10.1002/fsn3.1525
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., . . . Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *Int J Mol Sci*, *16*(7), 14832-14849. doi: 10.3390/ijms160714832
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., & Vargas, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, *41*, 297-313.
- Valera, M. J., Poehlein, A., Torija, M. J., Haack, F. S., Daniel, R., Streit, W. R., . . . Mas, A. (2015). Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter europaeus* CECT 8546, a Cellulose-Producing Strain of Vinegar Elaborated by the Traditional Method. *Genome announcements*, *3*(5), e01231-01215. doi: 10.1128/genomeA.01231-15
- Vigentini, I., Fabrizio, V., Dellacà, F., Rossi, S., Azario, I., Mondin, C., . . . Foschino, R. (2019). Set-Up of Bacterial Cellulose Production From the Genus *Komagataeibacter* and Its Use in a Gluten-Free Bakery Product as a Case Study. *Frontiers in microbiology*, *10*(1953). doi: 10.3389/fmicb.2019.01953
- Yadav, J. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol Adv*, *33*(6 Pt 1), 756-774. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, *104*(7), 2749-2764. doi: 10.1007/s00253-020-10408-2

ANEXOS

Anexo 1. Lista de las especies de *Komagataeibacter* utilizadas en el estudio

Microorganismo	Tipo de Secuencia	Longitud de la secuencia (bp)	Número de acceso NCBI
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain K2G30	16S		Obtenida gracias a los autores del artículo Exploring K2G30 Genome: A High Bacterial Cellulose Producing Strain in Glucose and Mannitol Based Media
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain NBRC 15237	16S	1414	AB680815.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain NCIB 11664	16S	1481	NR_036787.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ZUSTBC001	16S	1329	MK386709.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain OTG001	16S	1454	MT730006.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain SGP8	16S	1269	MT250918.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain SB3.1	16S	1257	MN588308.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain B2-1	16S	1391	MK714036.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ATCC 5352	16S	1173	MN103854.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain 4.2	16S	1182	MN103852.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain LMG 1515	16S	1352	NR_118191.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain MARGA58	16S	1333	MF777039.1

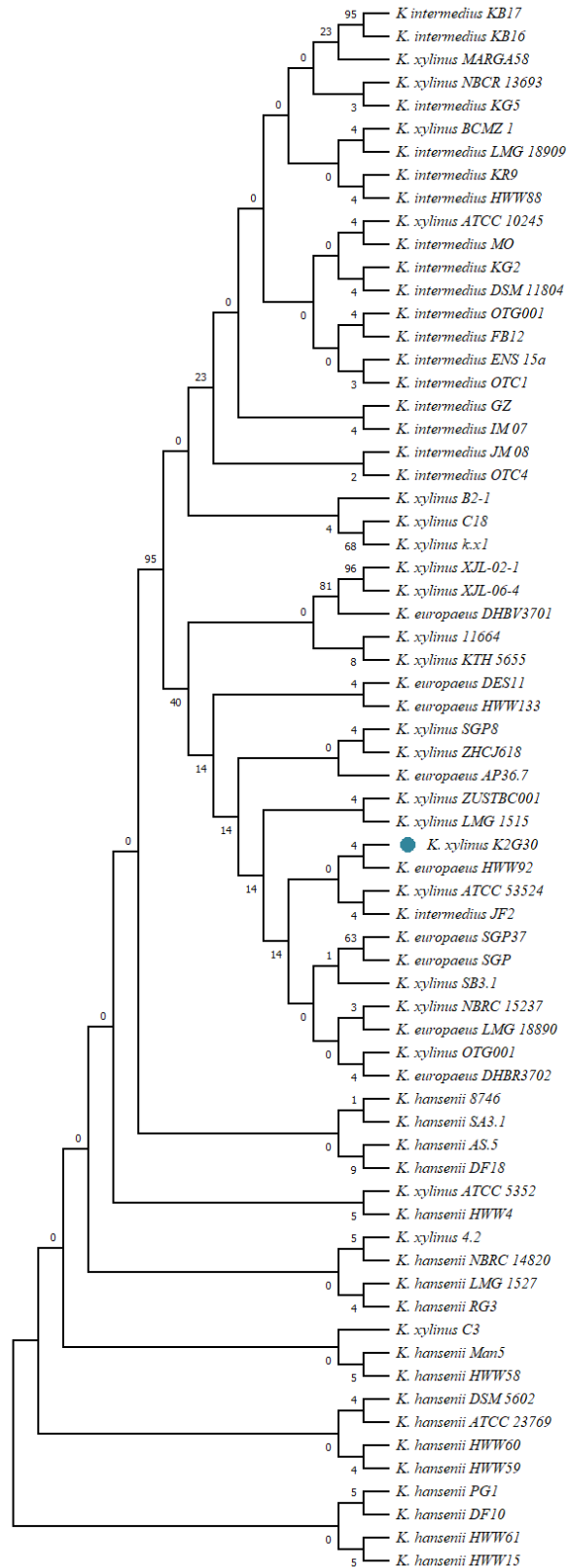
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain XJL-02-1	16S	1357	MH511551.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ZHCJ618	16S	1390	MG451840.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain C18	16S	1211	KY315818.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain BCMZ 1	16S	1345	KY487064.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain k.x1	16S	1388	KY711526.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain KTH 5655	16S	1368	KX216694.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain NBCR 13693	16S	1387	KX216693.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ATCC 10245	16S	1386	KX216690.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain ATCC 53524	16S	1372	KX216689.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain C3	16S	1314	KU598766.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i> strain XJL-06-4	16S	1355	MH447173.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i>			
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain DES11	16S	1482	NR_026513.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain AP36.7	16S	1014	MT791392.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain LMG 18890	16S	1354	NR_118176.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain DHBV3701	16S	1547	MH845623.1

<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain DHBR3702	16S	1419	MH845618.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain HWW133	16S	1392	MH424888.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain HWW92	16S	1390	MH424847.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain SGP37	16S	1493	KJ101597.1
<i>Komagataeibacter europaeus</i> strain SGP	16S	1507	KJ025079.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i>			
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain NCIB 8746	16S	1481	NR_026133.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain SA3.1	16S	959	MN588309.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain DSM 5602	16S	1352	NR_118178.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain LMG 1527	16S	1352	NR_118177.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain NBRC 14820	16S	1414	NR_113674.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain AS.5	16S	906	MH109871.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain PG1	16S	1467	MH484172.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain DF18	16S	1315	MH484163.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain DF10	16S	1460	MH484052.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain ATCC 23769	16S	1374	KX216691.1

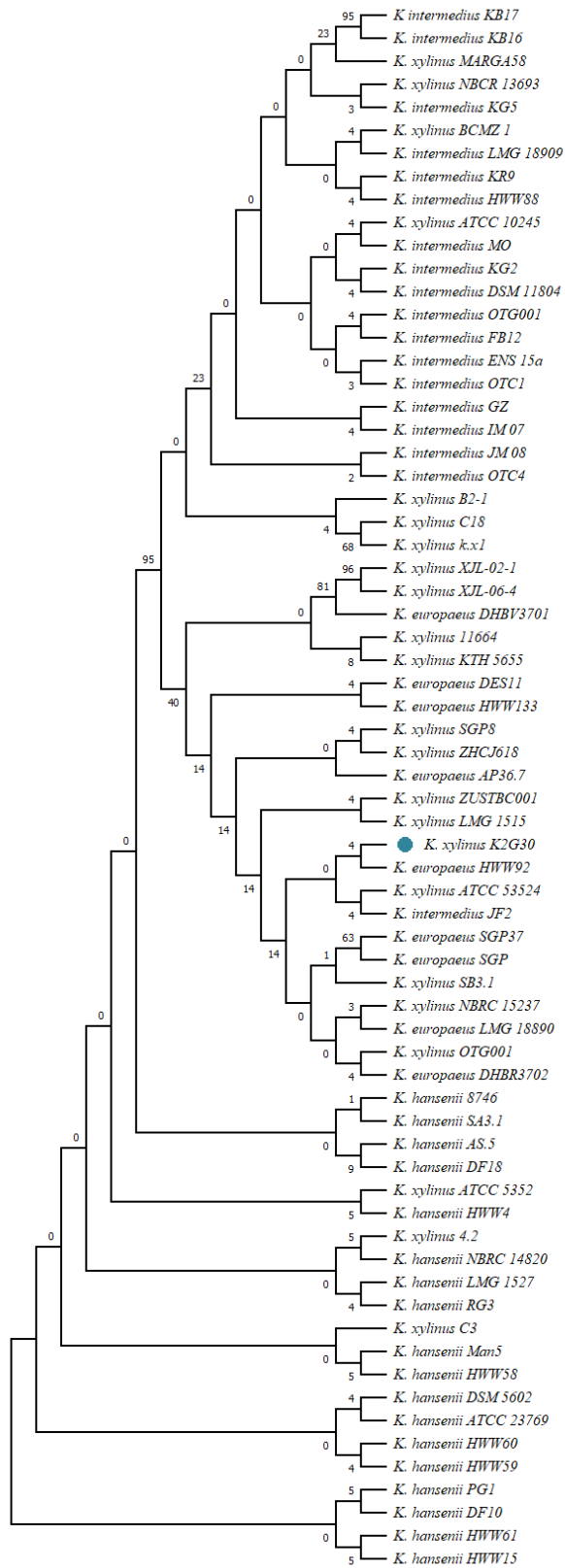
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain RG3	16S	1442	NR_043112.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain Man5	16S	1460	MH482946.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW61	16S	1402	MH424816.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW60	16S	1399	MH424815.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW59	16S	1404	MH424814.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW58	16S	1402	MH424813.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW15	16S	1399	MH424770.1
<i>Komagataeibacter hansenii</i> strain HWW4	16S	1388	MH424759.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i>			
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain JF2	16S	1376	MH553300.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain GZ	16S	1330	MW031771.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain MO	16S	1330	MW031770.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain OTG001	16S	1421	MT730007.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain KB17	16S	1102	MK099873.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain KG5	16S	1130	MK099871.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain KG2	16S	1128	MK099870.1

<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain KR9	16S	1247	MK099861.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain FB12	16S	1221	MK099859.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain KB16	16S	1104	MK099858.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain ENS 15a	16S	1431	MT094082.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	16S	1352	NR_118180.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain LMG 18909	16S	1351	NR_118179.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain HWW88	16S	1392	MH424843.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain JM_08	16S	1367	KU686737.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain IM_07	16S	1407	KU686736.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain OTC1	16S	1297	KT894754.1
<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain OTC4	16S	1363	KT894755.1

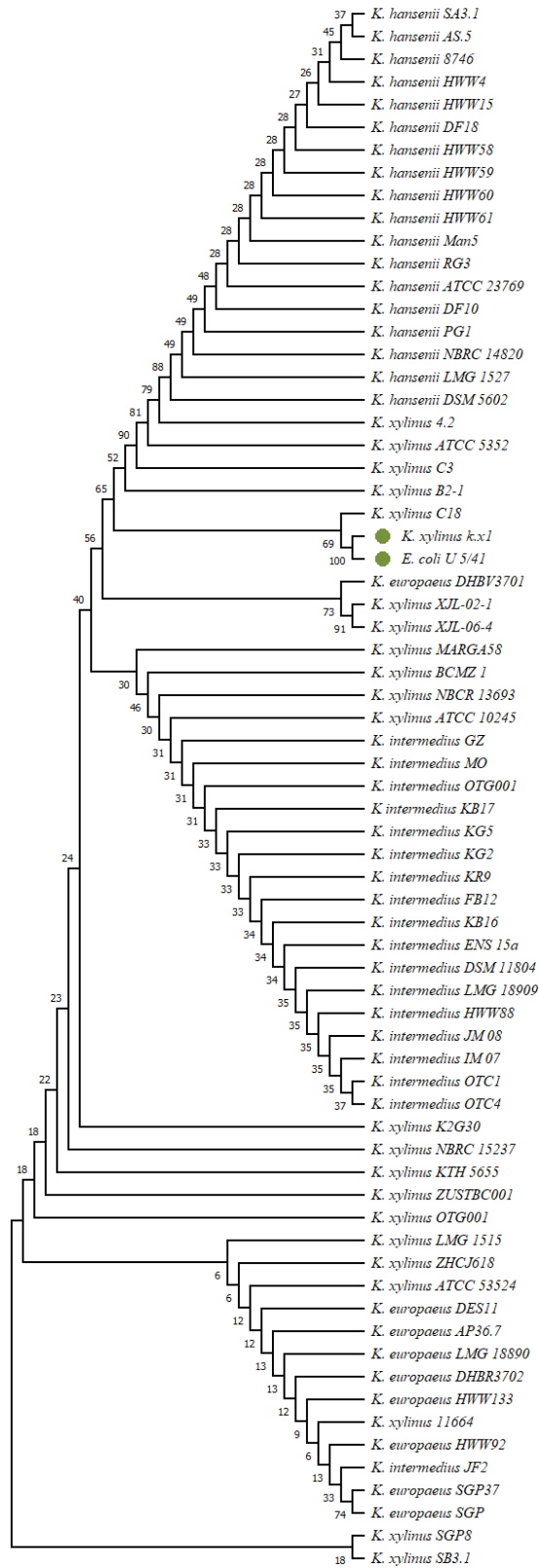
Anexo 2. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de *K. xylinus* K2G30 y otras cepas.



Anexo 3. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación de *K. xylinus* K2G30 y otras cepas

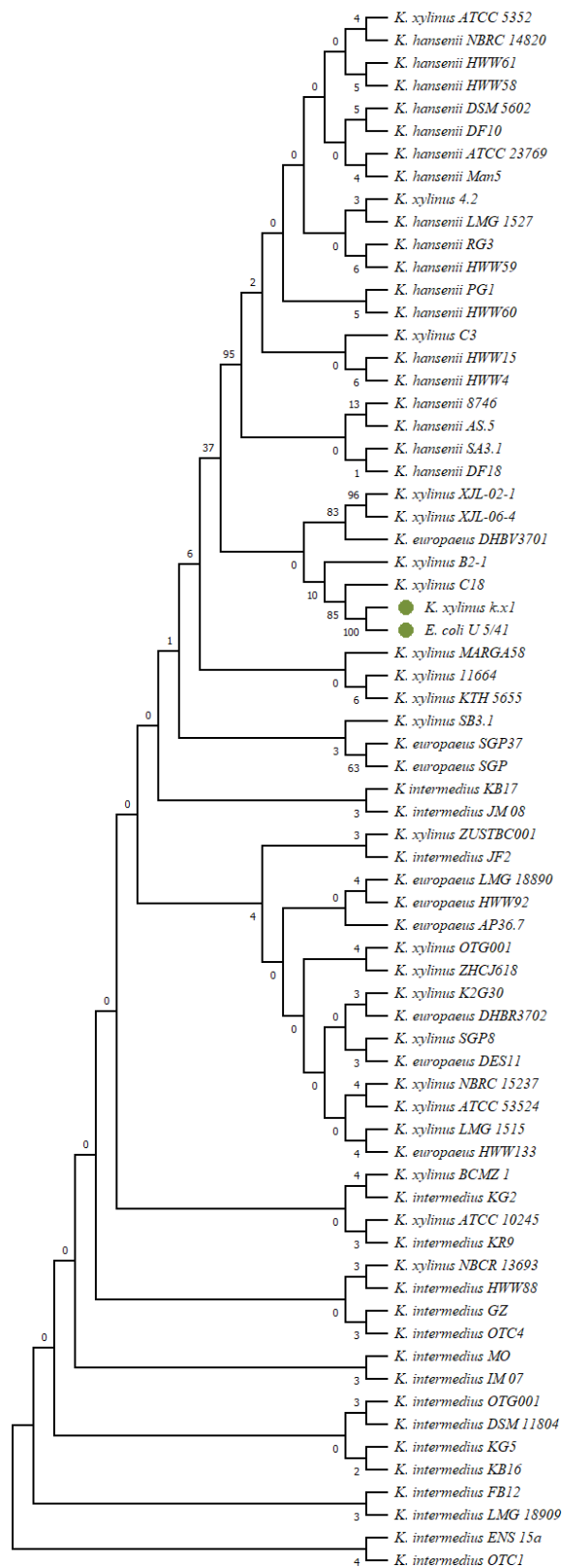


Anexo 4. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) Bootstrap basado en secuencias ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de *Komagataeibacter* y *E. coli* U 5/41

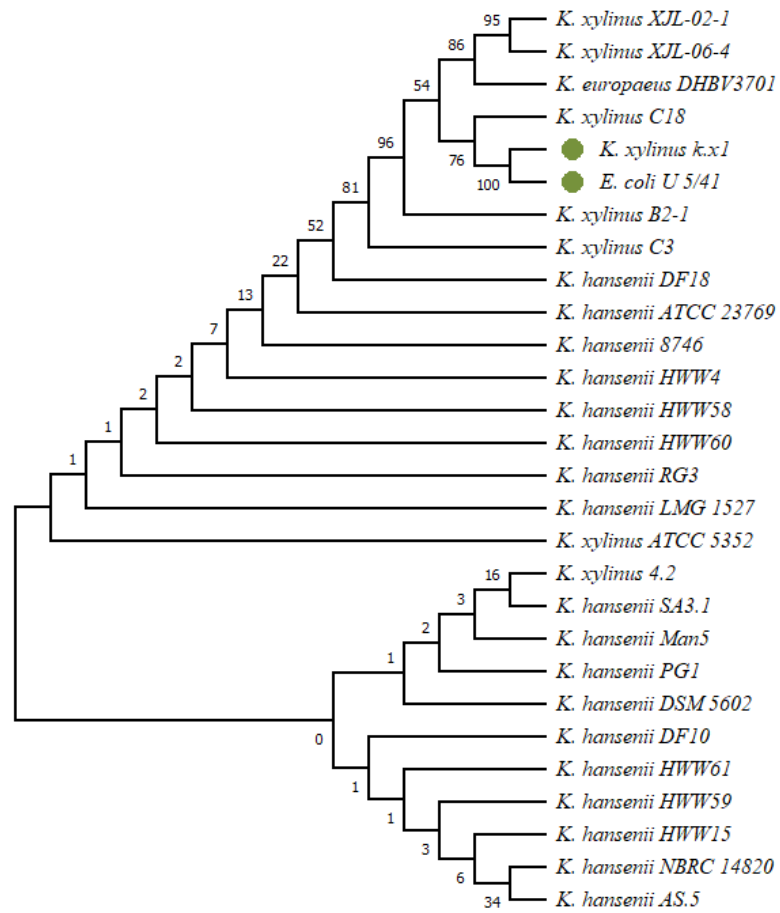


Anexo 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias del gen de ARNr 16S que muestra la comparación entre las cepas de *Komagataeibacter* y *E. coli*

U 5/41



Anexo 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud Bootstrap basado en secuencias ARNr 16S que muestra la similitud entre *K. xylinus* k.x1 y *E. coli* U 5/41



Anexo 7. Medios H-S con sustitución total de glucosa



Anexo 8. Biofilms en medio H-S con sustitución de total de glucosa por ácido láctico

