



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



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

UNIDAD DE TITULACIÓN

**Análisis *in silico* de las rutas metabólicas necesarias para la síntesis de celulosa
bacteriana en *Komagataeibacter xylinus* a partir de lactosa**

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del 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: Zapata Berrones Karina Elizabeth

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato - Ecuador

Septiembre 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

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 en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 29 de Julio del 2022

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Karina Elizabeth Zapata Berrones, 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.



Karina Elizabeth Zapata Berrones

C.I. 171955086-3

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

Dr. Calero Cáceres William Ricardo
C.I. 1714348859

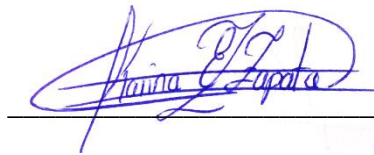
Mg. Galarza Galarza Cristian Fernando
C.I. 1803160272

Ambato, 30 de Agosto del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, haga de este trabajo de titulación, un documento disponible para su lectura, consulta y proceso 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.



Karina Elizabeth Zapata Berrones

C.I. 171955086-3

AUTORA

DEDICATORIA

Dedicado a Dios, ya que su gracia y bendición han permanecido conmigo siempre, pues su diestra me sostuvo, fortaleció mi camino y me guió a pesar de mis errores.

A mis padres y hermanos, por su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, porque constantemente han sido mi mejor consuelo, motivación e inspiración para hacer mis sueños realidad.

A Manuel Zapata, mi ángel de la guarda, quien eternamente residirá en mi mente y formará parte de mi corazón.

A mis abuelos Judith Suárez y Manuel Berrones, aquellos que con todo su corazón me brindaron su afecto, alegría y calidez, siendo su luz mi más grande bendición y sus oraciones la guía y protección de mis pasos.

Ustedes son mi vida entera, todo se los debo y sin ustedes nada sería.

Con amor

Karina

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por su infinito amor y las promesas que ha dado a mi vida; porque sus misericordias son nuevas cada mañana, por tanto “El SEÑOR es todo lo que tengo.

¡En el esperar!”

Lamentaciones 3:23

A mi madre, Lucia Berrones, por su lucha constante, inmenso amor, comprensión y paciencia. Eres mi más grande bendición y el ejemplo de mujer que aspiro poder llegar a ser algún día. Me siento afortunada de tenerte, pues no quiero imaginarme una vida sin ti. Te amo con toda el alma.

A Manuel Zapata (QEPD), mi padre, con quien tuve un tiempo corto de convivencia, pero logré amar con todo mí ser. Solo Dios sabe la causa por la que no puedes formar parte de este momento, de manera que donde quiera que te encuentres agradezco tu compañía y simultáneamente doy gracias por tu amor y cuidado. No hay un solo día en el que pueda dejar de extrañarte, sin embargo, reconozco que nunca te has apartado de mi vida a pesar de encontrarte a la diestra de nuestro Señor todo poderoso.

A Pedro Campos, mi segundo padre, a quien retribuyo la mayor parte de mis logros y ambiciones. Papá, no tengo palabras para corresponder a todo el amor y confianza que has depositado en mí, pues tu llegaste a cambiar mi vida por completo. Eres mi mejor amigo y mi súper héroe favorito. Gracias por que a pesar de un camino lleno de adversidades, me regalaste una familia y sobre todo esa mano amiga, que con esfuerzo y sacrificio, dio lugar a que me transforme en la mujer que soy ahora.

A mis extraordinarios hermanos Alex, Manuel y Ricardo, quienes desde siempre han sido los mejores compañeros de aventura y con quien he compartido alegrías, tristezas y locuras. Ustedes han sido constantemente mi inspiración y fortaleza. Gracias por todas sus enseñanzas, pues de su esfuerzo y perseverancia aprendí que a pesar de las dificultades puedo llegar a alcanzar mis sueños y más grandes anhelos.

A mis abuelos Manuel Berrones y Judith Suárez (QEPD), los amores más grandes de mi vida. Me faltaría la vida para corresponder a todo el afecto que me brindaron, ya

que sus oraciones direccionaron mis pasos y su luz aclaro mi camino. Aunque ya no se encuentren conmigo, sé que al igual que yo anhelaban que este día llegaré, mis pajaritos ¡Lo logramos!

A mis sobrinos Alessandro y Violeta Zapata, por su genuino amor y por haber sido mi más grande consuelo en momentos de estrés y/o aflicción. Sus ocurrencias me permitieron olvidar mis consternaciones y mantenerme recia, de manera que doy gracias por cada gesto de cariño y afecto que me regalaron. Espero que este proyecto pueda servir de ejemplo en sus vidas.

A mis queridos compinches y mejores amigos; María José Hernández, Pamela Oñate Javier Ojeda y María Belén Álvarez, por el cariño y sostén que me brindaron en las diferentes etapas de mi vida. Así mismo quiero agradecer a Julissa Chulde, Fabricio Jácome, Ximena López, y Tamara Culqui, por su amistad incondicional, las experiencias vividas y sobre todo por haberse convertido en mi segunda familia, al abrirme las puertas de su casa, además de protegerme y cuidarme en Ambato, ciudad que se convirtió en mi segundo hogar.

A mi tutor, Dr. Mario García, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, brindarme de su conocimiento y permitirme desarrollar este proyecto bajo su tutela y dirección. Gracias por su amistad, apoyo, paciencia y dedicación, ya que sin ello, este proyecto no habría sido posible. En este particular, también quiero agradecer a la Dra. Liliana Cerda, por su contribución, aporte y apoyo.

A la Universidad Técnica de Ambato y en exclusivo a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB), por haberme dado la oportunidad de desarrollarme tanto ética como profesionalmente dentro de sus instalaciones, otorgándome maestros extraordinarios y educación de excelencia.

Y a todas las personas que influyeron mi vida de manera positiva y me acompañaron en este largo camino.

Con gran gratitud infinita

Karina

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

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 CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 Celulosa bacteriana	2
1.1.2.1 Estructura y Composición	3
1.1.2.2 Propiedades.....	6
1.1.2.2.1 Propiedades morfológicas.....	7
1.1.2.2.2 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas	7
1.1.2.3 Aplicaciones y usos de la celulosa bacteriana en la industria	8
1.1.2.3.1 Industria Alimentaria	8
1.1.2.3.2 Industria biomédica y farmacéutica	10
1.1.2.3.3 Industria papelera.....	12
1.1.2.3.4 Industria textil	13
1.1.3 Microorganismos productores de celulosa bacteriana	13
1.1.3.1 <i>Komagataeibacter xylinus</i>	14

1.1.4	Producción de celulosa bacteriana	18
1.1.4.1	Biosíntesis.....	18
1.1.4.2	Complejo celulosa sintasa	20
1.1.5	Métodos de obtención de celulosa bacteriana	22
1.1.5.1	Técnicas de fermentación.....	22
1.1.5.1.1	Cultivo agitado.....	22
1.1.5.1.2	Cultivo estático	23
1.1.5.2	Condiciones de cultivo	24
1.1.5.3	Matrices para producción de celulosa bacteriana.....	26
1.1.6	Metabolismo de lactosa en bacterias.....	28
1.1.7	Lactosa como matriz para producción de celulosa	29
1.2	Objetivos.....	30
1.2.1	Objetivo General	30
1.2.2	Objetivos Específicos.....	30
CAPÍTULO II		31
METODOLOGÍA		31
2.1	Materiales y equipos.....	31
2.1.1	Materiales.....	31
2.1.2	Equipos.....	31
2.2	Métodos	32
2.2.1	Recopilación de genes 16S y genomas completos.....	32
2.2.2	Construcción de árbol filogenético	32
2.2.3	Comparación de secuencias genómicas de especies de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	32
2.2.4	Identificación y selección de genes y/o enzimas a introducir en <i>Komagataeibacter xylinus</i> para el proceso de biosíntesis de celulosa.....	33
2.2.5	Desarrollo de ruta sintética para biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de Lactosa.....	34

CAPÍTULO III.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1 Análisis y discusión de los resultados	35
3.1.1 Análisis comparativo de secuencias.....	35
3.1.2 Análisis filogenético.....	37
3.1.3 Análisis y selección de rutas metabólicas	44
3.1.4 Búsqueda de genes y selección de enzimas óptimas para la biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de lactosa.....	49
3.1.4.1 Permeasa lactosa (Lactosa/H ⁺).....	52
3.1.4.2 β - galactosidasa	54
3.1.4.3 Galactoquinasa	57
3.1.4.4 Galactosa-1-P-uridiltransferasa	61
3.1.5 Diseño y construcción de ruta metabólica para producción de celulosa a partir de lactosa.....	63
3.2 Verificación de la hipótesis	66
3.2.1 Hipótesis nula (H ₀)	66
3.2.2 Hipótesis alternativa (H ₁).....	66
CAPÍTULO IV.....	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
4.1 Conclusiones.....	67
4.2 Recomendaciones	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
ANEXOS.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas y mecánicas de la celulosa bacteriana.....	8
Tabla 2. Microorganismos productores de celulosa bacteriana	14
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	15
Tabla 4. Características generales de <i>Komagataeibacter xylinus</i>	15

Tabla 5. Características bioquímicas identificadas en <i>K. xylinus</i>	17
Tabla 6. Genes involucrados en la biosíntesis de celulosa bacteriana	18
Tabla 7. Complejo celulosa sintasa (EC 2.4.1.12)	21
Tabla 8. Secuencias 16S y genomas completos de <i>Komagataeibacter xylinus</i> registrados en GenBank	36
Tabla 9. Modelos de sustitución de nucleótidos	39
Tabla 10. Proteínas y/o genes que interceden en el proceso de biosíntesis de Celulosa bacteriana, identificadas en el genoma de <i>K. xylinus</i> E25	45
Tabla 12. Enzima EC 3.2.1.23 (β –galactosidasa)	54
Tabla 13. Enzima EC 2.7.1.6 (galactoquinasa)	58
Tabla 14. Enzima EC 2.7.7.10; EC 2.7.7.12 (galactosa-1-P-uridiltransferasa)	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Celulosa Bacteriana	4
Figura 2. Composición de cadena de celulosa (n=DP; grado de polimerización).	4
Figura 3. Esquema de formación de celulosa bacteriana.	5
Figura 4. Producción de celulosa I y II en <i>K.xylinus</i>	6
Figura 5. <i>Komagataeibacter xylinus</i> visualizado mediante microscopía electrónica de barrido	16
Figura 6. Esquema general de Biosíntesis de celulosa bacteriana	20
Figura 7. Esquema de formación y extrusión de celulosa bacteriana en <i>K. xylinus</i> .	20
Figura 8. Organización del complejo proteico celulosa sintasa.....	22
Figura 9. Biofilm de celulosa bacteriana obtenido a partir de medio Hestrin-Schramm en cultivo agitado	23
Figura 10. Biofilm de celulosa bacteriana obtenida a partir de medio Hestrin-Schramm en cultivo estático.....	24
Figura 11. Metabolismo de lactosa	28
Figura 12. Control de genes presentes en <i>Komagateibacter xylinus</i> E25 a partir del recurso digital NCBI-Genome	33
Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNr 16S de las cepas de <i>Komagataeibacter xylinus</i> reportadas.....	38
Figura 14. Árbol filogenético inferido por el método probabilístico “Maximum Likelihood” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de <i>K. xylinus</i>	41

Figura 15. Árbol filogenético inferido por el método de distancia “Neighbor-Joining” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de <i>K. xylinus</i>	42
Figura 16. Árbol filogenético inferido por el método probabilístico “Maximum Likelihood” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de las cepas <i>K. xylinus</i> TJUD2, E25 y DSM 2004.....	43
Figura 17. Esquema general de biosíntesis de celulosa en bacterias ácido acéticas con respecto a cepas <i>K. xylinus</i>	45
Figura 18. Esquema general de transporte y metabolismo de lactosa en bacterias ácido lácticas.....	48
Figura 19. Búsqueda de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en el genoma <i>K.xylinus</i> E25.....	50
Figura 20. Búsqueda de genes involucrados en el metabolismo de la lactosa en el genoma de <i>K.xylinus</i> E25.....	51
Figura 21. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos del simportador Lactosa-Permeasa tomado de <i>Escherichia coli</i> K-12.....	53
Figura 22. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ATCC 27009.....	57
Figura 23. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima galactoquinasa (EC 2.7.1.6) de <i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i> ATCC 15697.....	60
Figura 24. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima galactosa-1-P-uridiltransferasa (EC 2.7.7.10/EC 2.7.7.12) de la cepa mutante <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue.....	63
Figura 25. Ruta biosintética de producción de celulosa a partir de lactosa como sustrato principal en <i>K. xylinus</i> E25.....	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencias 16S de <i>K. xylinus</i> implementadas en análisis filogenético..	101
Anexo 2. Genomas completos de <i>Komagataeibacter xylinus</i> reportados en NCBI102	
Anexo 3. Porcentaje de similitud entre secuencias 16S de diferentes cepas <i>K. xylinus</i> en contraste a DSM2004 mediante BLAST.....	103
Anexo 4. Modelos de sustitución de nucleótidos.....	104
Anexo 5. Modelo de sustitución de nucleótidos HKY+G.....	105
Anexo 6. Cromosoma y plásmidos del genoma de <i>Komagataeibacter xylinus</i> E25105	

Anexo 7. Biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de múltiples fuentes de carbono	106
Anexo 8. Metabolismo de lactosa / galactosa en bacterias ácido lácticas	107
Anexo 9. Control positivo (genes encargados de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada)	108
Anexo 10. Resultados completos de la β – galactosidasa obtenidos de la base de datos BRENDA	108
Anexo 11. Actividades enzimáticas de la β –galactosidasa.....	112
Anexo 12. Resultados completos de la galactoquinasa reportados en la base de datos BRENDA	113
Anexo 13. Resultados completos de la Galactosa-1-P-uridiltransferasa obtenidos de la base de datos BRENDA	114
Anexo 14. Genes involucrados en el metabolismo de lactosa seleccionados para la producción heteróloga de proteínas	114
Anexo 15. Red metabólica de biogénesis de celulosa a partir de lactosa en <i>Komagataeibacter xylinus</i>	115

RESUMEN

La celulosa bacteriana simboliza un recurso multifacético de capacidades excepcionales y propiedades fascinantes. Actualmente, la demanda de este exopolisacárido ha aumentado progresivamente, en función de la optimización de procesos e implementación de residuos agroindustriales, como fuentes de carbono alternativas. En tal contexto, el arquetipo productor (*K. xylinus*), representa uno de los organismos más valiosos dentro del campo biotecnológico, escenario que ha permitido evidenciar su poder descomunal, para sintetizar CB a partir de una amplia gama de sustratos. No obstante, algunos autores han elucidado su incapacidad para metabolizar lactosa, provocada por la falta de los genes, encargados del transporte y catabolismo de lactosa. Aquí, DSM 2004 y la cepa análoga E25 (identificada mediante un análisis filogenético), se estudiaron con el objetivo de identificar los genes faltantes y el equipamiento genético mínimo. Se llevó a cabo un análisis crítico de rutas metabólicas en BAL y BAA, a fin de enlistar el transportador y las enzimas participantes del proceso de interés. En este particular, las proteínas compendiadas fueron evaluadas acorde a parámetros cinéticos, donde los mejores resultados reportan código de acceso y secuencia del gen que las codifica. En este particular, se seleccionaron los genes de *Escherichia coli* K-12 (Permeasa Lactosa), *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009 (Beta – galactosidasa), *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* ATCC 15697 (galactoquinasa), y *Escherichia coli* XLI-Blue (galactosa-1-P-uridiltransferasa). Finalmente, el modelamiento de la nueva ruta biosintética presentó dos módulos conexos; i) Transporte e hidrólisis de Lactosa y ii) Biosíntesis de CB, aptos para la producción de CB, tras la sustitución total de la glucosa por lactosa.

Palabras Clave: Análisis filogenético, Bioinformática, Biosíntesis, Celulosa bacteriana (CB), *Komagataeibacter xylinus*, suero lácteo, lactosa, ruta biosintética.

ABSTRACT

Bacterial Cellulose symbolizes a multifaceted resource of exceptional capabilities and fascinating properties. Currently, the demand for this exopolysaccharide has progressively increasing, in function of the optimization of processes and the implementation of agro-industrial waste as alternative carbon sources. In such a context, the archetype productor (*K. xylinus*) represents one of the most valuable organisms in the biotechnological field, a scenario that has made it possible to demonstrate its enormous power to synthesize BC from a wide range of substrates. However, some authors have elucidated its inability to metabolize lactose, caused by the lack of genes responsible for the transport and catabolism of this substrate. Here, DSM 2004 and the analogous strain E25 (identified by phylogenetic analysis), were studied with the aim of identifying missing genes and minimal genetic equipment. A critical analysis of metabolic pathways in BAL and BAA was carried out in order to list the transporter and the enzymes involved in the process of interest. In this particular, the summarized proteins were evaluated according to kinetic parameters, where the best results report access code and both peptide and nucleotide sequence of the gene that encodes them. In this particular, the genes of *Escherichia coli* K-12 (Lactose permease), *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009 (β – galactosidase), *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* ATCC 15697 (galactokinase), and *Escherichia coli* XLI-Blue (galactose-1-P-uridyltransferase) were selected.). Finally, the modeling of the new biosynthetic route presented two related modules: i) Transport and hydrolysis of Lactose and ii) Biosynthesis of CB, after the total replacement of glucose by whey lactose.

Keywords: Phylogenetic analysis, Bioinformatics, Biosynthesis, Bacterial cellulose (CB), *Komagataeibacter xylinus*, whey, lactose, biosynthetic pathway.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

La celulosa bacteriana (CB) constituye un biopolímero extracelular de elevado valor agregado, sintetizado mediante bacterias del género *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, y *Sarcina* (Perna et al., 2016). Su descubrimiento se remonta al año 1886 por John Brown, pero solo fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando esta macromolécula adquirió importancia y se estableció como objeto de atención y estudio (A. J. Brown, 1886; Jacek et al., 2019). Este polímero representa uno de los metabolitos más relevantes de la industria ya que, en comparación con la celulosa vegetal (CV), difiere en conformación, cristalinidad (>60%) y ostenta un grado de pureza elevado, con un índice bajo de generación de residuos (Carreño et al., 2012; Hernández, 2018). Además, la CB posee diversas ventajas, tales como excelentes propiedades fisicoquímicas y mecánicas, versatilidad y bajo costo de producción, que la hacen atractiva para múltiples aplicaciones dentro de los campos farmacéuticos, alimentarios y tecnológicos (J. Wang et al., 2019). Sin embargo, la problemática predominante en la producción de CB está relacionada al costo y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas para el cultivo microbiano, lo cual puede afectar el rendimiento y cristalinidad del polímero (Jozala et al., 2015; Vazquez et al., 2013).

Los organismos productores de CB más representativos son las bacterias Gram negativas del género *Gluconacetobacter*, al cual corresponde *Komagataeibacter xylinus*, la especie más eficiente por su capacidad excepcional para sintetizar elevadas concentraciones de celulosa (Pradas, 2019). De este modo, *K. xylinus* es descrito como el arquetipo o modelo de estudio de la biogénesis de celulosa a partir de la implementación de una gran variedad de sustratos, en donde se destaca el uso de subproductos agroindustriales como medio para la producción de polímero (R. M. Brown & Saxena, 2000; Souza et al., 2020).

En este sentido, al hablar de la contaminación ocasionada por parte de la industria láctea, el suero de leche se establece como uno de los principales residuos liberados al ambiente (Amaro et al., 2019). No obstante, con el paso de los años, este subproducto ha adquirido gran valor por su alto contenido de nutrientes, lo cual ha permitido el desarrollo de varios productos, incluyendo medios de cultivo de bajo costo para la producción de polímeros (W. Czaja et al., 2006; Revin et al., 2018). Sin embargo, Balseca (2021) demostró que la falta del gen *lacZ* en *K. xylinus* (DSM2004), el cual se encarga de la producción de la enzima β -galactosidasa, no permite la hidrólisis de la lactosa en sus monómeros estructurales, galactosa y glucosa. Por consiguiente, esto impide el aprovechamiento del lacto suero como sustrato para la producción de CB mediante *K. xylinus*. Los diversos reportes bibliográficos enfocados en el análisis de la síntesis de celulosa bacteriana por *K. xylinus* proporcionan una fuente confiable de información, misma que se enfoca tanto en la biosíntesis como en la estructura, aplicaciones, y propiedades de la CB (C.- Pacheco et al., 2004). Así mismo, las rutas de catabolismo de la lactosa se encuentran ampliamente descritas en varios modelos, incluyendo *Escherichia coli* y *Lactobacillus bulgaricus* (Axelsson et al., 2004; Martínez, 2014), lo cual permite identificar genes clave ausentes en *K. xylinus*.

Considerando estos antecedentes, el presente proyecto plantea diseñar una ruta biosintética para la obtención de CB en *K. xylinus* empleando lactosa como fuente de carbono. La ruta se describirá a partir del análisis de vías metabólicas e identificación de enzimas y genes necesarios para la absorción de la lactosa y su conversión en monómeros de glucosa. De esta forma, el presente proyecto representará el punto de partida para la construcción de proyectos de investigación que persigan emplear el suero lácteo como sustrato para la síntesis de productos con valor agregado y mitigar el impacto de este residuo en el medio ambiente.

1.1.2 Celulosa bacteriana

En los últimos años, se ha despertado gran interés en torno al estudio, caracterización e implementación de la celulosa bacteriana, como un metabolito de elevado valor agregado (Gallegos et al., 2016). Esto ocurre debido al estallido de investigaciones relacionadas con el origen, estructura, propiedades, aplicaciones, etc.,

tópicos que en literatura han sido analizados y expuestos desde la segunda mitad del siglo XX (Jacek et al., 2019; Lahiri et al., 2021).

La CB representa un recurso emergente de interés sustancial, que ha sido partícipe de prometedores ensayos centrados en el desarrollo de materiales alternativos a los polímeros convencionales, escenario que ha permitido evidenciar su descomunal potencial en una amplia gama de campos (Hu et al., 2014; Lustrì et al., 2015; Nitkiewicz et al., 2020). Por esta razón, hoy en día, esta macromolécula se considera como un exopolisacárido multifacético puntualizado como un compuesto orgánico, renovable, biodegradable y versátil, que es obtenido principalmente a partir de procesos fermentativos en bacterias del género *Acetobacter*, las cuales utilizan una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (Eslahi et al., 2020; Jonas & Farah, 1998).

1.1.2.1 Estructura y Composición

Actualmente, la celulosa bacteriana (CB) simboliza un homopolímero altamente funcional con características y propiedades fascinantes, el cual, dentro del campo científico, ha ganado progresivamente importancia a causa de la creciente concientización y el uso de tecnologías verdes a favor de la sostenibilidad ambiental. Esto ha motivado el desarrollo de un incontable número de investigaciones exhaustivas y sistemáticas, direccionadas a analizar su estructura y composición, a fin de ampliar el conocimiento sobre esta base biológica (Baghaei & Skrifvars, 2020; Finny et al., 2021).

Esta macromolécula presenta una composición semejante a la celulosa vegetal (43,6 – 45 % de carbono, 6 – 6,5% de hidrógeno y el remanente constituido por oxígeno), aunque mantiene diferencias significativas con respecto a su composición elemental (CB: 98% celulosa, 0% lignina y 0% hemicelulosa; CV: varía respecto a la fuente) y propiedades (Compton, 1948; Liu et al., 2018a). Químicamente este exopolisacárido definido por la ecuación $(C_6H_{10}O_5)_n$, representa una estructura lineal no ramificada conformada por 2000 a 14000 unidades de β -D-glucopiranosas conexas por enlaces glicosídicos β -(1,4) (Figura 1a), los cuales inician con la formación del intermediario celobiosa en el sitio de unión de la glucosa UDP (Klemm et al., 2005).

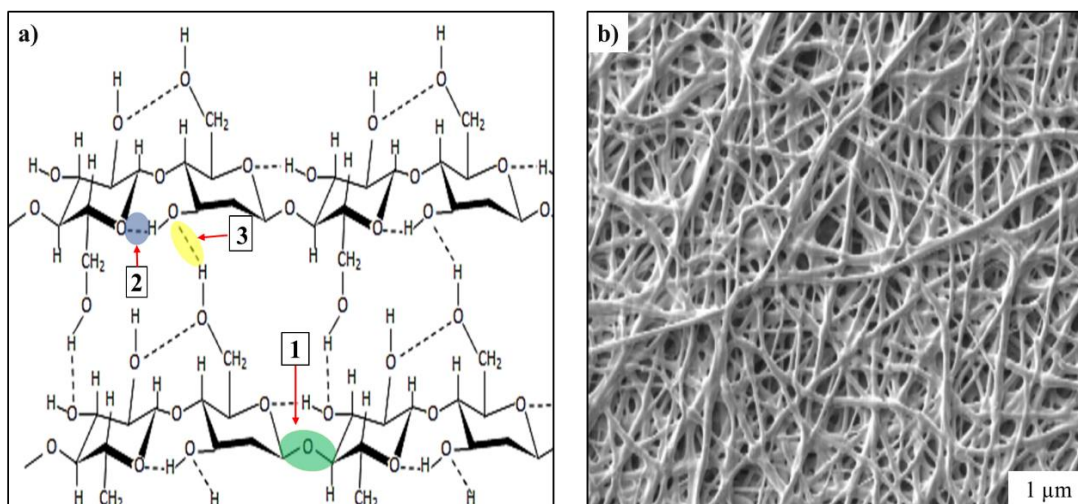


Figura 1. Celulosa Bacteriana. (a) Estructura química: 1. Enlaces glicosídicos, 2. Puentes de hidrogeno, 3. Puentes de hidrogeno entre cadenas; (b) Fibras de celulosa visualizadas a través de un microscopio

La cadena de CB tal como se presenta en la figura 2, consiste en una estructura básica conformada por un extremo reductor (D-glucosa con un grupo C4OH), una unidad estructural repetida (celobiosa) y un extremo no reductor (C1-OH) que se encuentra en equilibrio con la estructura aldehído (Cerda, 2016). Las cadenas de glucosa promueven la formación de una serie de conexiones intra e intermoleculares (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals); vínculos que permiten la obtención de una estructura supramolecular de elevada cristalinidad (Figura 1a y b), ya que estas conexiones se encargan de la morfología, orientación e incluso reactividad de las cadenas (Esa et al., 2014; Römling, 2002).

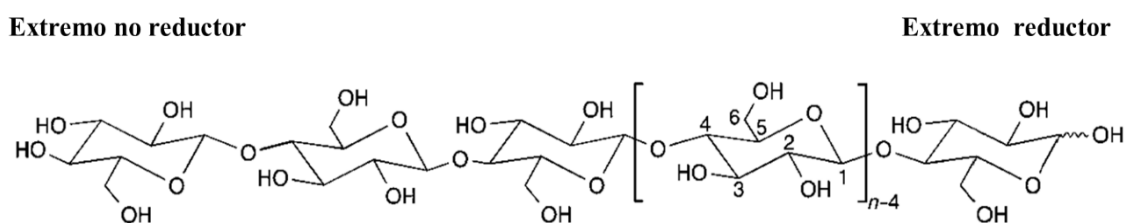


Figura 2. Composición de cadena de celulosa ($n=DP$; grado de polimerización).

(Figura modificada de Klemm et al., 2005).

Como se observa en la figura 3, CB se sintetiza partir de pequeños poros situados en la envoltura celular del cuerpo bacteriano, donde este compuesto se

produce en forma de extrusiones de cadenas de glucosa, las cuales se asocian formando subfibrillas (1,5 nm de ancho) que mediante un proceso de autoensamblaje se cristalizan dentro del medio de cultivo y constituyen microfibrillas. Las microfibrillas se fusionan desde cada uno de los sitios sintéticos y se agrupan a manera de paquetes, dando paso a la generación cintas o fibras (4 nm de espesor, 117 nm de ancho y una longitud de 20 μm), que al agregarse al azar, finalmente permiten el desarrollo de una estructura tridimensional reticulada ultrafina (hidrogel; película flotante) semejante a la expuesta en la figura 1b (Gayathry & Gopaldaswamy, 2014; Santos et al., 2016)

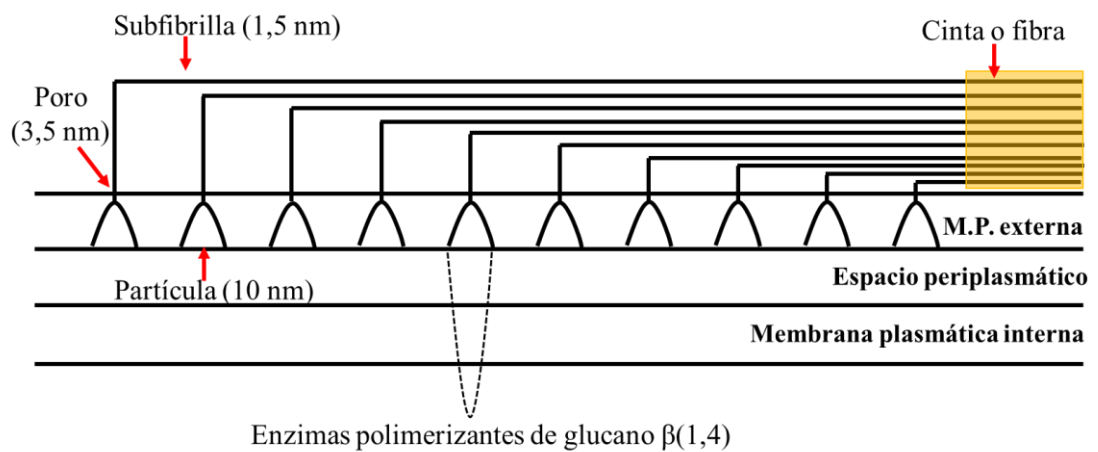


Figura 3. Esquema de formación de celulosa bacteriana.

(Figura modificada de Jonas & Farah, 1998)

Múltiples investigaciones sugieren que dependiendo del mecanismo de cristalización, se puede obtener diferentes tipos de celulosa. Esto debido a que estas estructuras elementales, poseen dos características primordiales que recaen en la polaridad unidireccional y espesor variable, de tal forma que si se tiene una disposición paralela se sintetiza celulosa I (Semejante a una cinta; sitio catalítico de la celulosa sintetasa orientado al citoplasma) y si el ajuste es anti paralelo se genera celulosa II (Termodinámicamente estable; sitio catalítico de la celulosa sintetasa orientado al espacio extracelular). Ambas formas pueden ser producidas por un mismo organismo y son predominantes en la naturaleza (Figura 4), en comparación a las aloformas III y IV, las cuales pueden sintetizarse al aplicar calor o algún tratamiento químico (Carreño et al., 2012; Chawla et al., 2009; C.- Pacheco et al., 2004).

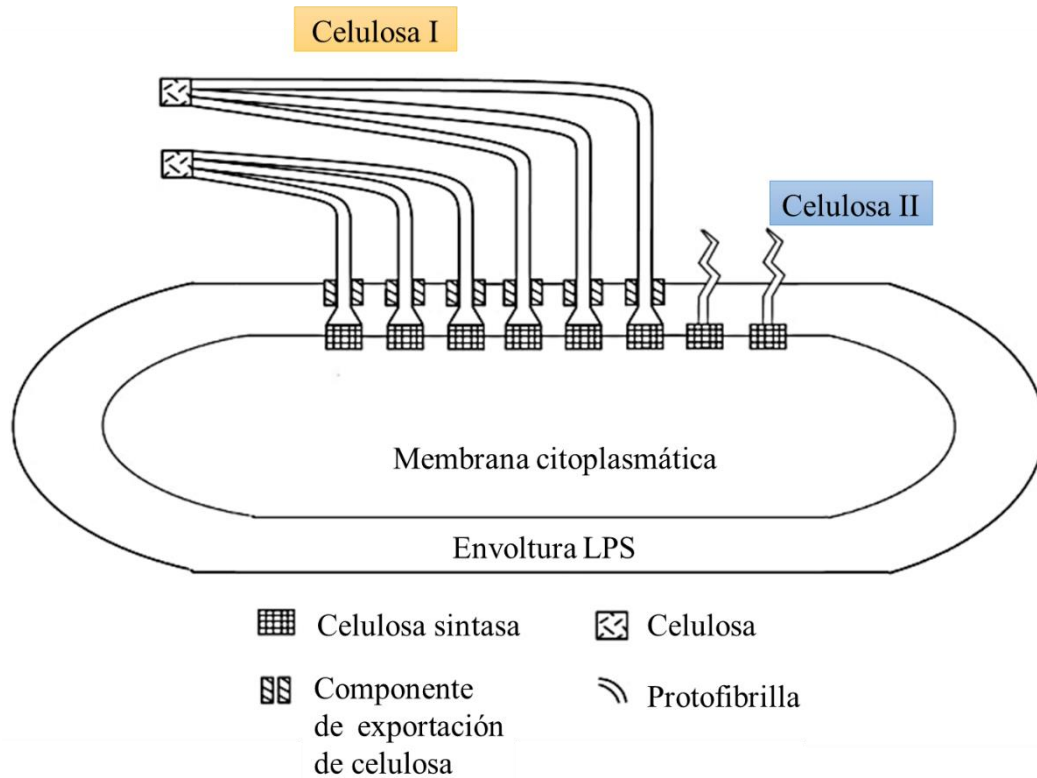


Figura 4. Producción de celulosa I y II en *K.xylinus*.

(Figura extraída de Chawla *et al.*, 2009)

1.1.2.2 Propiedades

La CB es un exopolisacárido renovable, estable y multifacético, el cual representa un material de elevado interés biológico, que en los últimos años y con la creciente concientización sobre la sostenibilidad ambiental, ha alcanzado gran impacto como objeto de estudio dentro de investigaciones que tienen como finalidad desarrollar una alternativa a los polímeros sintéticos (R. M. Brown & Saxena, 2000; Lahiri et al., 2021).

Seguidamente, se describen las propiedades de la celulosa bacteriana en torno al análisis y una recopilación de diversos parámetros asociados tanto a aspectos morfológicos, fisicoquímicos y mecánicos.

1.1.2.2.1 Propiedades morfológicas

La celulosa es el homopolímero más abundante en la tierra, constituido por una red reticulada de cintas o fibras, las cuales están conformadas por nanoestructuras que contienen alrededor de 30 a 100 cadenas de β -D-glucopiranososa apiladas de formas paralela y orientadas uniaxialmente (**J. K. Park et al., 2009**).

Las cintas de celulosa en esta estructura supramolecular representa un valor aproximado de 0,9 % del contenido neto, mientras que el resto está conformado por agua libre en 98,8 % y agua ligada en 0,3%. En este sentido, las fibras de medida nanométrica proporcionan una amplia superficie interna. La gran cantidad de grupos hidroxilo presentes en la molécula de glucosa permiten la formación de interacciones con alrededor del 90 % de las moléculas de agua (H_2O) y por ende concede una alta capacidad de retención (**W. Czaja et al., 2006; Gelin et al., 2007**).

1.1.2.2.2 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas

Este biopolímero es un material prometedor de elevada pureza, estabilidad térmica y propiedades únicas (**Panaitescu et al., 2016**). Si bien CB presenta características naturales excepcionalmente eficientes, las propiedades fisicoquímicas de este homopolímero dependen ampliamente de las condiciones de biosíntesis y del procesamiento. Mientras que en el caso de las propiedades mecánicas, estas son dependientes de la conformación y la estructura. Las propiedades y la cantidad de celulosa, pueden ser controladas y/o modificadas durante el proceso de biogénesis, de tal manera, que el incremento o la mejora de la propiedad pueden producirse debido al organismo implementado, las condiciones de cultivo e incluso la purificación o eliminación de impurezas de los geles (**Chawla et al., 2009; W. Czaja et al., 2006; Retegi et al., 2010**).

En la tabla 1, se recopiló los parámetros más representativos asociados a las características específicas de la celulosa bacteriana.

Tabla 1. *Propiedades físico-químicas y mecánicas de la celulosa bacteriana*

Propiedades	Parámetro	Valor	Unidad
Físico- Químicas	Densidad	1,35 – 1,59	$\frac{g}{cm^3}$
	Cristalinidad	60 – 80	%
	Humedad	93,97	%
	Grado de polimerización	14000-16000	Unidades de glucosa
	Porosidad	> 85	%
	Temperatura de degradación	290 – 298	°C
	Temperatura de fusión	120,4	°C
	Temperatura de transición vítrea	13,90	°C
Mecánicas	Módulo de Elasticidad	15 – 35	<i>GPa</i>
	Esfuerzo de tracción	200 – 300	<i>MPa</i>
	Elongación	1,50 – 2,00	%

Fuente: (J. Wang et al., 2019; Yamanaka et al., 1989)

1.1.2.3 Aplicaciones y usos de la celulosa bacteriana en la industria

La celulosa representa un biomaterial innovador comúnmente destinado al desarrollo de múltiples procesos y una amplia gama de propósitos. Esto debido a que combina una serie de propiedades que permiten considerarlo como una alternativa atractiva a los polímeros convencionales y uno de los metabolitos más relevantes de la industria (Fu et al., 2013; J. Wang et al., 2019).

En vista a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia y versatilidad, las aplicaciones y usos más importantes de la celulosa bacteriana pueden resumirse en las siguientes categorías:

1.1.2.3.1 Industria Alimentaria

La Industria alimentaria se ha ido desarrollado con el transcurso tiempo, por lo que progresivamente ha evolucionado y experimentado un proceso de diversificación.

Este sector productivo es encargado de llevar a cabo los procesos asociados a la cadena alimentaria, ya que se encuentra conformado por un conjunto de actividades encaminadas al tratamiento, transformación y conservación de alimentos (**Recordati, 2015**). La CB juega un papel fundamental dentro del sector alimentario, debido a proporciona una base atractiva para un sinnúmero de procesos y por ende el desarrollo de una amplia variedad de productos, dado que actúa como un agente espesante, estabilizante y ligante (**Chawla et al., 2009; D. N. Thompson & Hamilton, 2001**).

El uso más antiguo de este metabolito corresponde a la nata de coco, un postre de origen filipino desarrollado a través de la fermentación del agua de coco mediante *Komagataeibacter xylinus*, proceso que tiene como fin la obtención de una película comestible de al menos un 1 cm de grosor, la cual para su consumo requiere ser cortada, lavada y servida junto a algún licor o en conjunto con jarabes de sabores (**Halib et al., 2012**). Otro ejemplo importante es el uso de consorcios microbianos de bacterias acetogénicas y fermentativas para la producción del té Kombucha, una bebida fermentada con propiedades revitalizantes en la cual la CB se produce como producto secundario que brinda soporte para el crecimiento microbiano (**Vargas, 2013**).

A continuación, se presentan ensayos recientes relacionados a posibles aplicaciones de la celulosa bacteriana dentro de este campo:

Toscano, (2019), desarrolló un estudio enfocado en la “Estimación de la vida útil de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*”, con la finalidad de prolongar la vida útil y mejorar las características morfológicas de la fruta por medio de la aplicación de un biopolímero de tipo comestible. Los resultados obtenidos dentro de este ensayo reflejaron una respuesta positiva al recubrimiento, debido a que este proporcionó protección tanto física como biológica y además produjo un incremento de la vida útil del fruto a un tiempo correspondiente a 9 días a una temperatura de 4 °C. Estas condiciones permitieron conservar las características post cosecha iniciales, dado que este biopolímero actúa como una barrera protectora.

Vigentini et al., (2019), estudiaron la síntesis de celulosa bacteriana y su uso en la elaboración de un producto de panadería sin gluten. En esta investigación se

evaluó la productividad de la celulosa a partir de 5 especies diferentes *Komagataeibacter*, las cuales fueron sometidas a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, de tal forma que los resultados del proyecto revelaron que la cepa con mayor rendimiento de producción de CB fue *K. rhaeticus* cepa LMG22126T. Además, este estudio reveló que las mediciones de los parámetros tecnológicos y el horneado, generaron una respuesta favorable para su implementación en el desarrollo de alimentos novedosos.

Atta et al., (2021), en un estudio sobre el “Desarrollo y caracterización de biopelículas de celulosa antimicrobiana incorporadas para aplicaciones de envasado de alimentos comestibles”, concluyeron que las propiedades y ventajas que proporciona la celulosa bacteriana sobre los envases convencionales son descomunales, ya que han abierto un sinnúmero de oportunidades. Esto debido a que la combinación CB/CMC/gly/levadura (Celulosa bacteriana + carboximetilcelulosa + glicerol + levadura) mostró buenos resultados al preservar el olor, color y textura de los alimentos en contra los factores ambientales.

1.1.2.3.2 Industria biomédica y farmacéutica

Durante varios años, este sector ha sido considerado como un componente importante del sistema de asistencia sanitaria a nivel mundial, ya que está conformado por diversas organizaciones dedicadas a la investigación, desarrollo y comercialización de productos, los cuales tienen como objetivo mejorar la calidad de vida del ser humano en torno al tratamiento y prevención de enfermedades (**Bajaña & Mocayo, 2012; Tait, 1998**).

Los avances tecnológicos y científicos asociados a la implementación de la celulosa bacteriana en esta industria, han permitido el mejoramiento de los procesos y por ende la obtención de productos dotados de mejores actividades terapéuticas (**Ghajarieh et al., 2021; Portela et al., 2019**). Esto se debe a que CB ha sido participe de múltiples investigaciones centradas en una gran variedad de aplicaciones, de las cuales se puede destacar la elaboración de apósitos, dispositivos biomédicos, materiales para vendajes, implantes e injertos; elementos desarrollados a partir del aprovechamiento de la biocompatibilidad, pureza, porosidad, termoestabilidad y resistencia mecánica (**Y. Y. Li et al., 2018; Rajwade et al., 2015**).

Consecutivamente, se muestran los estudios y aplicaciones más relevantes de la celulosa para este sector.

Fontana et al., (1990), estudiaron el efecto de la implementación de una “Película de celulosa de *Acetobacter* como sustituto temporal de la piel”, con el objetivo de desarrollar una herramienta eficaz e ideal para el tratamiento de heridas a partir de la evaluación de diversos tipos de vendajes. Los resultados obtenidos tras el desarrollo de la parte experimental, demostraron que en comparación a otro tipo de materiales, Biofill® proporcionó un mejor efecto con respecto al alivio del dolor, protección contra infecciones y disminución del tiempo de cicatrización, de tal manera que esto reflejó una respuesta favorable al aplicar este material sobre los tejidos afectados. El estudio desarrollado por este equipo, es considerado como el primero en marcar una pauta sobre el uso de la celulosa bacteriana como base para el tratamiento de úlceras y piel quemada (**W. K. Czaja et al., 2007; Lasa et al., 2005**).

Bäckdahl et al., (2006), evaluaron las “Propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana e interacciones con las células del músculo liso” a partir del desarrollo de andamios de micro porosidad controlada y la evaluación de la celulosa bacteriana como biomaterial novedoso para la elaboración de vasos sanguíneos de ingeniería tisular (TEBV por sus siglas en inglés). En este estudio, se examinó tanto la morfología como las propiedades mecánicas de CB, a fin de realizar una comparación exhaustiva de las ventajas que otorga la celulosa en contraste al uso de arterias carótidas de origen animal e injertos de ePTFE (politetrafluoroetileno expandido). Los resultados de los ensayos experimentales entorno a la unión, proliferación y crecimiento de las células de músculo liso, permitieron confirmar el elevado potencial de la celulosa con respecto al desarrollo de injertos vasculares de bajo calibre, los cuales simbolizan una alternativa llamativa para superar las dificultades de reconstrucción relacionados con enfermedades vasculares.

Zhang et al., (2018), desarrollaron una membrana de doble capa conformada de una película inferior de celulosa bacteriana (CB) y una película superior electrohilada de ácido poli (láctico-co-glicólico) con nanotubos de carbono de capa múltiple (MWNT), a fin de estudiar el efecto de un biofilm de PLGA/MWNT/CB como prototipo de membrana para la regeneración de tejido periodontal (GTR) en

perros Beagle. Además a partir de ensayos experimentales postoperatorios valorados a las 12 semanas, concluyeron que la mejor base fisiológica para regeneración de tejido fue PLGA/MWNT/CB en comparación a las demás membranas del grupo de control, ya que dentro de las evaluaciones esta manifestó una respuesta positiva en torno a la reconstrucción de tejido. Esto se debió a que se detectaron abundantes aglomeraciones de hueso lamelar dentro de los defectos y se confirmó la proliferación activa mediante la presencia de osteoblastos situados en el borde óseo, resultados que motivaron el desarrollo de tejido periodontal nuevo.

1.1.2.3.3 Industria papelera

La industria de pulpa y papel ha ido adaptándose y evolucionando con el transcurso del tiempo, por lo que progresivamente ha experimentado un proceso exhaustivo de cambios enfocados en el desarrollo de productos novedosos a base de fibras vegetales (**Teschke, 2009**).

En los últimos años, el sector papelerero, a fin de satisfacer la creciente demanda del mercado, se ha enfocado en la búsqueda de nuevas fuentes de materia prima; motivo por el cual, han surgido diversas investigaciones centradas en la modificación de la estructura de las pastas y el aprovechamiento de las propiedades que presenta la celulosa en combinación con otros polímeros (**Torres et al., 2012**). La CB en conjunto con las fibras de origen vegetal cumple un papel importante dentro de este campo, ya que proporcionan un sistema óptimo para la restauración y fabricación de productos de papel con una mayor resistencia y flexibilidad en comparación a los fabricados exclusivamente con CV (**Mbituyimana et al., 2021; Surma et al., 2008**).

Uno de las aplicaciones más interesantes corresponde al ensayo realizado por **Santos, (2015)**, quien estudió las características de la celulosa obtenida a partir de *G. sucrofermentans* (CECT7291) y su probable uso como biomaterial de refuerzo para la conservación y restauración de documentos históricos a partir del seguimiento de dos protocolos que confirmaron el comportamiento inalterable de la celulosa bacteriana a lo largo del tiempo, esto debido a que se observó que los índices de desgarró y estallido mantienen el valor original aunque haya iniciado el proceso de envejecimiento. Además, concluyó que la CB proporciona una barrera protectora eficaz para evitar los

efectos que causan diversos factores de degradación, independientemente del tipo de papel restaurado.

1.1.2.3.4 Industria textil

La industria textil es una de las actividades económicas más avanzadas e importantes del mundo, dedicada a la fabricación de una amplia variedad de productos (fibras, hilos y tejidos) relacionados a procesos de confección y manufactura de prendas (**Girneata, 2015**). Dentro de este sector, la celulosa bacteriana ha sido comercialmente explotada como materia prima óptima para la producción de telas libres de compuestos de origen vegetal. Esto ocurre debido a que en comparación a la celulosa de plantas, la CB proporciona una matriz adaptable y pura, la cual para su fabricación no requiere de un consumo elevado de agua y energía (**Huang et al., 2014**).

Uno de los ejemplos más relevantes de esta aplicación es el producto denominado Nullarbor fiber™ de la empresa australiana **Nanollose ltd (2020)**, una organización pionera dedicada al desarrollo de diversos proyectos enfocados en la transformación de residuos orgánicos a celulosa bacteriana de alto rendimiento, la cual permite la elaboración de fibras textiles de rayón con la finalidad de confeccionar prendas de vestir de impacto ambiental mínimo. Cabe mencionar que este tipo de productos presentan una extensa gama de ventajas, mismas pueden ser aprovechadas para la obtención de procesos más eficientes y su expansión futura en distintas áreas como una alternativa sostenible a las fibras a base de petróleo (nailon, acrílico, poliéster y polipropileno) y las fibras de plantas (rayón y cupramonio) (**Wei & Zimmermann, 2017; Chunyan Zhong, 2020**).

1.1.3 Microorganismos productores de celulosa bacteriana

La celulosa constituye probablemente la molécula orgánica más versátil y biocompatible de la tierra, cuya síntesis se encuentra diversificada en la naturaleza. Su producción es desarrollada por una gran variedad de organismos tanto eucariotas como procariotas (**C.- Pacheco et al., 2004; Pradas, 2019**).

Dentro del Reino Mónica, la biogénesis de celulosa representa un mecanismo coligado a la producción de polímeros extracelulares, el cual representa un proceso innato de una extensa cantidad bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*,

Gluconacetobacter, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, etc., tal como puede apreciarse en la información reportada en la tabla 2 (Jonas & Farah, 1998; Retegi et al., 2010). En este sentido, la celulosa constituye un producto específico del metabolismo primario obtenido a partir de diversas especies Gram negativas del género *Komagataeibacter*, al cual corresponden *K. hansenii*, *K. sucrofermentans*, *K. saccharivorans* y *K. xylinus*. Ejemplares que a lo largo de los años han alcanzado un interés significativo como modelos de investigación direccionados al desarrollo de estudios profundos sobre la biosíntesis celulosa a partir de diversas fuentes de carbono (Gama et al., 2013; McNamara et al., 2015; Serra et al., 2013).

Tabla 2. *Microorganismos productores de celulosa bacteriana*

Género	Estructura	Función
<i>Acetobacter</i>	Cintas	Conservación de un ambiente aeróbico
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas	Adherencia en los tejidos de las plantas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas (cortas)	Floculación en aguas residuales
<i>Sarcina</i>	CB amorfa	-
<i>Zoogloea</i>	-	Floculación en aguas residuales

Nota. Dato indefinido (-); La presente tabla otorga una descripción general con respecto a la producción de celulosa y la función biológica que cumple este polímero en cada caso. Cabe mencionar que la mayor parte de productores generan agregados amorfos como elemento integral de las biopelículas.

Fuente: (Jonas & Farah, 1998)

1.1.3.1 *Komagataeibacter xylinus*

Komagateibacter xylinus es un organismo mesófilo catalogado como una bacteria Gram negativa (Tabla 3), la cual constituye el arquetipo de estudio más representativo y el microorganismo productor de celulosa más antiguo (Keshk, 2014; Chunyan Zhong, 2020).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Komagataeibacter xylinus*

Categoría	Denominación
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Alphaproteobacteria</i>
Orden	<i>Rhodospirillales</i>
Familia	<i>Acetobacteraceae</i>
Género	<i>Komagataeibacter</i>
Especie	<i>Komagataeibacter xylinus</i>

Fuente: (NCBI Taxonomy Browser, 2020)

Esta bacteria descrita por primera vez en 1886 por A. J. Brown, se define como un organismo aerobio estricto que se caracteriza por desarrollar fermentación oxidativa teniendo como hábitat frutas y hortalizas en estado de descomposición. Así mismo, este microorganismo es comúnmente distinguido por su capacidad excepcional para transformar azúcares o cualquier tipo de sustancia orgánica en celulosa pura a través de diversos procesos metabólicos que conllevan lapsos de tiempo cortos (Tabla 4). Con respecto a su morfología, tal como se observa en la figura 5, este ejemplar es un microorganismo no patógeno de forma elipsoidal con aproximadamente 0,6-0,8 μm de ancho y 1.0-3.0 μm de largo. Las colonias formadas por *K. xylinus* presentan una tonalidad beige, además de una textura suave, un aspecto mucoso y un diámetro en un rango de 2,5 a 3mm dentro de un medio Hestrin- Schramm (Aydin & Aksoy, 2009; Lahiri et al., 2021; Yamada et al., 2012).

Tabla 4. Características generales de *Komagataeibacter xylinus*

	Origen/ aislamiento	Morfología	Características	Colonias	Oxidación
<i>K. xylinus</i>	Frutas en proceso de descomposición/ residuos de vinagre	- Bacteria de forma elipsoidal - Tamaño,	- Aerobias estrictas - Gram negativas - Inmóviles	Tonalidad crema o beige	Acetato y lactato en CO_2 y Agua

0,6-0,8 x 1.0- 3.0 μm	-	Se presentan de forma individual, en parejas o dispuestas en cadena	2,5 a 3,0 mm de diámetro
-------------------------------------	---	---	--------------------------

Fuente: (Aydin & Aksoy, 2009; Campano et al., 2016; Kojima et al., 1998)

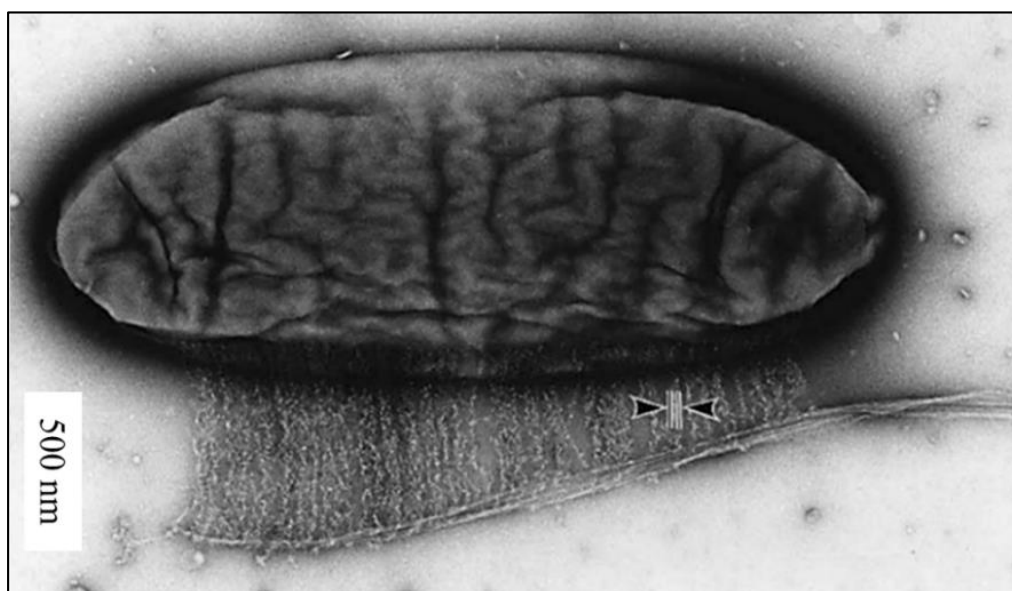


Figura 5. *Komagataeibacter xylinus* visualizado mediante microscopía electrónica de barrido

(Figura extraída de Campano et al., 2016)

Este tipo de especies, es capaz de oxidar tanto acetato como lactato en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), además de promover la producción de ácido metano carboxílico (CH_3COOH) mediante alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). En la tabla 5, se abordan las características bioquímicas más representativas de *K. xylinus*.

Tabla 5. Características bioquímicas identificadas en *K. xylinus*

Característica	Respuesta
Crecimiento en agar glutamato	-
Crecimiento en agar manitol	+
Catalasa	+
Formación de H ₂ S	-
Oxidasa	-
Oxidación de etanol	+
Producción de celulosa	+
Producción de indol	-
Sobreoxidación de ácido acético	+
Utilización de urea	-
Voges-Proskauer	-
<i>Producción de ácido de:</i>	
D-Glucosa	+
Fructosa	-
Lactosa	-
Maltosa	-
Manosa	+
Xylosa	+

Nota. Cumple (+); No cumple (-)

Fuente: (Aydin & Aksoy, 2009; Lavasani et al., 2017)

El genoma de *K. xylinus* tiene una longitud promedio de 3,56 Mpb con un contenido aproximado de GC del 62,33%, del cual se reportan alrededor de 3.193 genes identificados y cuatro operones bcs (*bcsI*, *bcsII*, *bcsIII* y *bcsIV*) donde únicamente el operon *bcsI* se encuentra estructuralmente completo y se encarga del mecanismo de producción de celulosa (Gullo et al., 2019; Liu et al., 2018a). La tabla 6, proporciona

una descripción general sobre los genes participantes en el proceso de biogénesis de celulosa y las funciones biológicas que estos desempeñan.

Tabla 6. *Genes involucrados en la biosíntesis de celulosa bacteriana*

Gen	Función
<i>bcsA</i>	Codifica para CS
<i>bcsB</i>	Codifica para CDGBP
<i>bcsC</i>	-
<i>bcsD</i>	-

Nota. CS (celulosa sintasa); CDGBP (proteína de unión a c-di-GMP); Dato Indefinido (-); Los genes *bcsC* y *bcsD*, no han sido caracterizados. No obstante se les atribuye funciones asociadas al ensamblaje y excreción del polímero al exterior de la célula.

Fuente: (Méndez & Membrillo, 2004)

1.1.4 Producción de celulosa bacteriana

Las bacterias del género *Komagataeibacter* producen celulosa a partir de la implementación de una amplia gama compuestos. Estos organismos aerobios, poseen múltiples razones para producir este polímero extracelular, mismas que se enfocan directamente en la conservación de un ambiente aeróbico (alta tasa de aireación) así como en el desarrollo de una barrera protectora (jaula) que tiene como finalidad evitar la desecación, el ingreso de rayos ultravioleta y los entornos químicos agresivos. La producción de hidrogeles de celulosa, se encuentra ligada a diversos procesos metabólicos, en donde puede destacarse el proceso de fermentación oxidativa de azúcares, mecanismo que permite la producción de este metabolito en la interfaz aire-medio de cultivo (Iguchi et al., 2000).

1.1.4.1 Biosíntesis

La biosíntesis de celulosa bacteriana ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los años. Este proceso metabólico consta de un mecanismo complejo, el cual implica tanto la presencia de enzimas individuales como complejos catalíticos y proteínas reguladoras. El modelo de biogénesis en procariotas, así como aquel en

plantas, efectúa la polimerización de los restos de UDP-glucosa en cadenas de glucano (β -1,4), dando lugar a la formación de cintas o fibras rígidas. Cabe recalcar que las reacciones bioquímicas de este proceso, tienen como productos intermedios a hexosas, monómeros de azúcar, y fosfatos, entre otras moléculas. (**R. M. Brown et al., 1976; Ross et al., 1991**).

La biogénesis de CB, se encuentra constituida de dos etapas trascendentales, que consisten en: 1) la conversión de la fuente de carbono a UDP-Glucosa, y 2) la formación de la celulosa y deyección de este metabolito al medio. La primera fase de este mecanismo manifiesta un proceso intrincado y preciso, el cual es llevado a cabo por varias enzimas que permiten la conversión de la glucosa a glucosa-6-P (glucoquinasa), la transformación de la glucosa-6-P a glucosa-1-P (fosfoglucomutasa) y la síntesis de UDP- glucosa (UDPG pirofosforilasa) (**K. Y. Lee et al., 2014; Lustri et al., 2015**). En la figura 6, se presenta un esquema general del metabolismo en bacterias, incluyendo la vía metabólica de obtención de celulosa.

Por otro lado, la segunda etapa consiste en la polimerización de UDP-Glucosa para dar lugar a la celulosa por medio de complejo enzimático celulosa sintasa, y del ensamblaje y cristalización de las cadenas. Cabe señalar que en *K. xylinus* el proceso de polimerización y ensamblaje están estrechamente ligados. Los organismos de la especie *Komagataeibacter* presentan un rango de entre 50 a 80 poros alineados a lo largo del eje axial de la membrana celular, siendo estas estructuras las que permiten la síntesis sincronizada de subfibrillas elementales de alrededor de 1,5 nm de diámetro; la fusión de estas subfibrillas forma la microfibrilla y el empaquetamiento de las microfibrillas da origen a las cintas de alta cristalinidad de 1,5 y 4 nm, que sobresalen de la célula para formar una película flotante (Figura 7) (**Lahiri et al., 2021; Reiniati et al., 2017; Ross et al., 1991**).

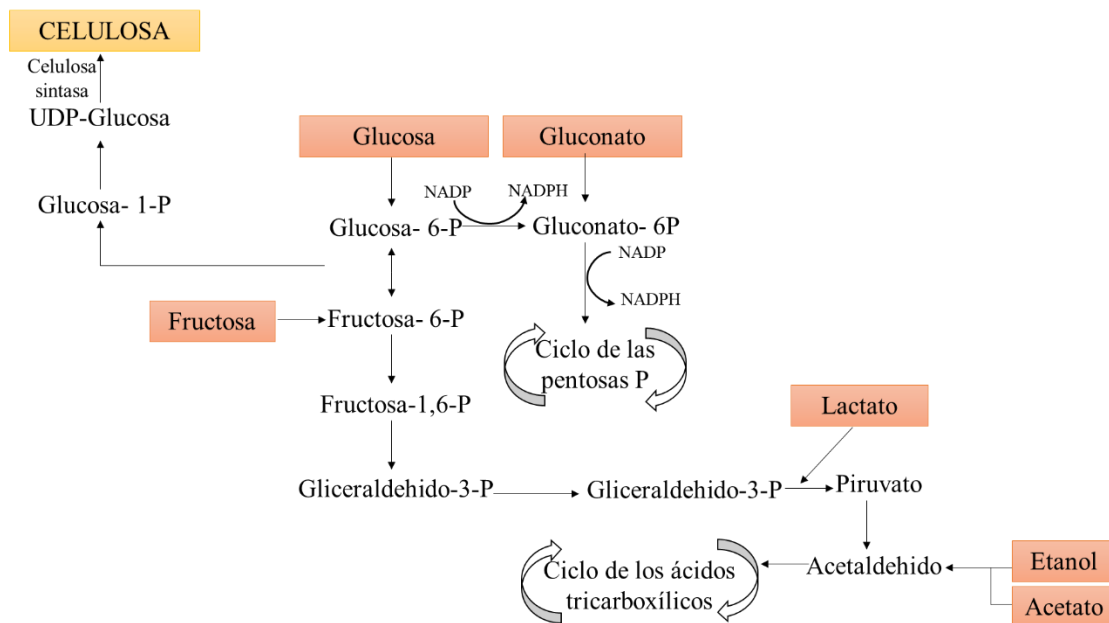


Figura 6. Esquema general de Biosíntesis de celulosa bacteriana

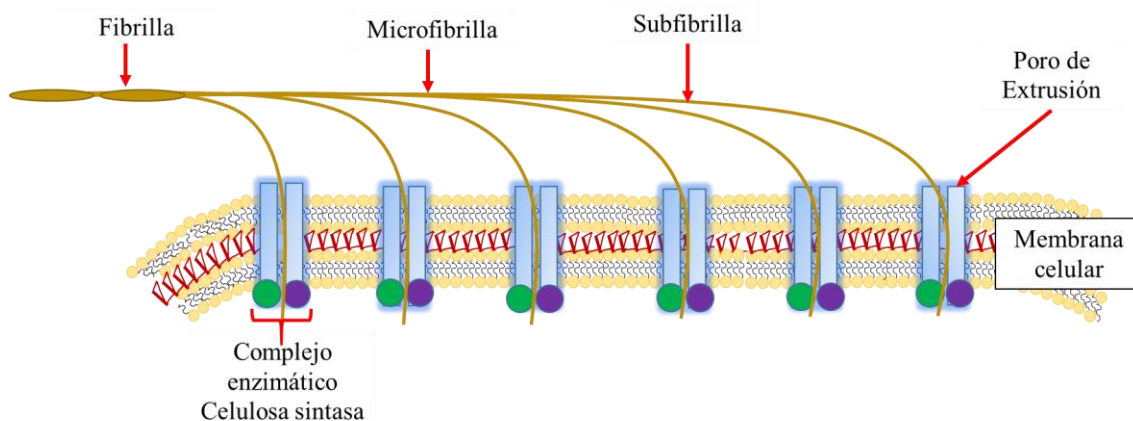


Figura 7. Esquema de formación y extrusión de celulosa bacteriana en *K. xylinus*

1.1.4.2 Complejo celulosa sintasa

La celulosa sintasa (EC 2.4.1.12) es una glicosiltransferasa formadora de GDP, denominada también β -1,4-D-glucano sintasa (Tabla 7), que se encarga tanto de la síntesis como de la translocación de la celulosa bacteriana a través de la membrana citoplasmática interna. Estructuralmente, tal como se observa en la figura 8, el complejo celulosa sintasa, *bcsAB*, está conformada por dos subunidades, la *bcsA* catalítica y *bcsB* reguladora. *bcsA* y *bcsB*, están acopladas por acción de una dualidad de hélices, llamadas 4p02A01 y 4p02B05 por la clasificación de estructuras de

proteínas CATH (Morgan et al., 2013; PDB, 2012). No obstante, en algunos casos la presencia de *bcsC* y *bcsD*, es necesaria para la producción máxima de celulosa, ya que de acuerdo a los estudios expuestos por Wong et al., (1990), el arquetipo de estudio para la biogénesis de celulosa (*Komagataeibacter*) contiene un operón (*bscI*) constituido por cuatro genes que codifican las proteínas *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* y *bcsD*, mismos que están acoplados transduccionalmente y se transcriben como ARNm policistrónico. Para activarse, este complejo proteico multicomponente requiere de la proteína de unión CDGBP (c-di-GMP), puesto que esta tiene afinidad por el activador alostérico c-di-GMP. Cabe señalar que en *K. xylinus* las condiciones óptimas para alcanzar la actividad máxima de este complejo proteico, están estrechamente relacionadas a una temperatura de 29 °C y un rango de pH comprendido entre 6,5 y 8,3 (BRENDA, 2022a; Glaser, 1958; Méndez & Membrillo, 2004).

Tabla 7. Complejo celulosa sintasa (EC 2.4.1.12)

Categoría	Descripción
Identificación	EC 2.4.1.12
Nombre	<ul style="list-style-type: none"> • Celulosa sintasa • 1,4-β-glucano sintasa • 1,4- β-D-glucano sintasa • Glucano sintasa • UDP glucosa: 1,4-β-D-glucosiltransferasa • Uridina difosfoglucosa - celulosa glucosiltransferasa
Clase	Transferasas; Glicosiltransferasas
Función	Interviene en la biogénesis de celulosa bacteriana, esta es responsable de la polimerización de celulosa a partir de UDP-glucosa
Sustrato	UDP-Glucosa
Producto	Uridina 5'- difosfato

Fuente: (BRENDA, 2022a; KEGG, 2022a)

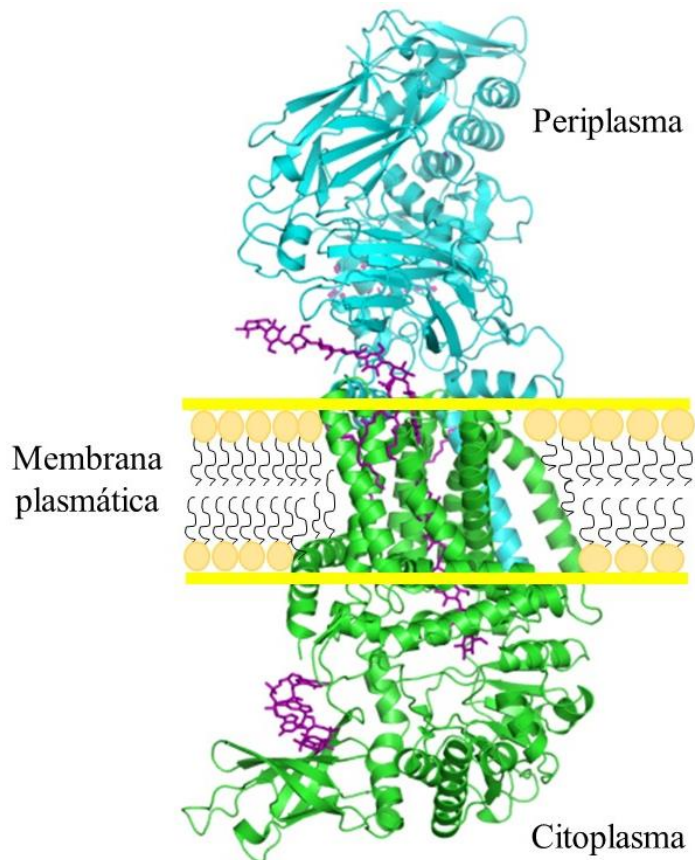


Figura 8. Organización del complejo proteico celulosa sintasa. *Subunidad catalítica, bcsA,* (tonalidad cian); *Subunidad reguladora, bcsB,* (tonalidad verde).

(Figura modificada de PDB, 2012)

1.1.5 Métodos de obtención de celulosa bacteriana

1.1.5.1 Técnicas de fermentación

Varios autores han evaluado diversas técnicas para la producción de CB. Los métodos más comunes utilizados para la obtención de este homopolímero son el cultivo agitado y estático. Sin embargo, cada proceso genera una biopelícula con una morfología y propiedades diferentes independientemente de las condiciones de cultivo (Carreño et al., 2012; Kadier et al., 2021).

1.1.5.1.1 Cultivo agitado

Las fermentaciones desarrolladas en cultivo agitando pueden realizarse en sistemas continuos o por lotes. Este tipo de técnicas implementan matraces agitados o

biorreactores (airlift o de tanque agitado), que permiten mantener la homogeneidad y por consiguiente una transferencia enriquecida de oxígeno en el medio. Sin embargo, su baja productividad hace que el proceso de escalado sea complejo, puesto que la agitación dentro de este tipo de cultivo, no favorece al crecimiento de la cepa de interés sino que promueve el desarrollo de organismos no productores, los cuales tienen la capacidad de sintetizar el ácido cetoglucónico y glucónico (**Hestrin & Schramm, 1954; Lahiri et al., 2021**). La formación de hidrogeles de celulosa acorde a este tipo de sistema, se relaciona con la obtención de partículas irregulares que permanecen suspendidas en el medio de cultivo, es decir que se genera la producción de aglomeraciones amorfas o pallets de este polímero extracelular (Figura 9) (**Carreño et al., 2012; Navarro, 2018**).



Figura 9. Biofilm de celulosa bacteriana obtenido a partir de medio Hestrin-Schramm en cultivo agitado. *Hidrogel con una formación multicapa, el cual contiene residuos y adherencias atrapadas.*

(Figura extraída de Palacios, 2019)

1.1.5.1.2 Cultivo estático

El cultivo estático es un método relativamente sencillo y comúnmente implementado para la obtención de celulosa bacteriana. La producción de CB en condiciones estáticas incorpora la adición del medio en una placa, frasco o bandeja profunda, la inoculación del organismo productor y el cultivo durante un periodo superior a 4 días o hasta que se visualiza la cobertura total de la interfaz aire-liquido por parte de una biopelícula reticulada, firme y opaca (Figura 10) (**Lustri et al., 2015;**

Pang et al., 2020). Este proceso fermentativo, se encuentra regulado por el suministro de carbono y la concentración de aire en el medio, en donde es importante señalar que únicamente las bacterias que se encuentran próximas a la interfaz, tienen disponibilidad de oxígeno y mantienen su actividad biológica (**Lahiri et al., 2021; Perna, 2013**). El proceso estático simboliza una técnica costosa, ya que involucra largos periodos de tiempo y un tamaño considerablemente amplio del área superficial para maximizar la producción, siendo esto una dificultad notoria en torno a la producción industrial (**Carreño et al., 2012**).



Figura 10. Biofilm de celulosa bacteriana obtenida a partir de medio Hestrin-Schramm en cultivo estático. *Biopelícula monocapa*

(Figura extraída de Palacios, 2019)

1.1.5.2 Condiciones de cultivo

La búsqueda de información sobre las condiciones óptimas para la maximizar la producción de celulosa ha sido ardua y compleja. En la literatura se han reportado diversos estudios relacionados con la capacidad de las bacterias del género *Komagataeibacter* para crecer y sintetizar celulosa en cualquier tipo de medio. Sin embargo, su desarrollo y actividad biológica requieren de parámetros y factores específicos aptos para su buen desenvolvimiento (**K. Y. Lee et al., 2014; Son et al., 2001**).

- ***Fuente de carbono***

Este tipo de componentes forman parte principal de los medios de cultivo, ya que son usados comúnmente por los microorganismos para el crecimiento, desarrollo y desempeño de funciones biológicas. Las fuentes de carbono (fructosa, sacarosa, manosa, etc.) actúan como precursores de las síntesis de glucosa mediante la gluconeogénesis. No obstante, en altas concentraciones pueden llegar a afectar e inhibir el crecimiento celular y por consiguiente la producción de CB, ya que este tipo de eventos dan lugar a la síntesis de ácidos glucónicos y cetoglucónicos por la disminución de pH (**Jaramillo et al., 2012**).

- ***Fuente de nitrógeno***

La fuente de nitrógeno es descrita como un factor de crecimiento indispensable para el metabolismo celular, la cual suele asociarse con peptonas y/o proteínas parcialmente hidrolizadas. Este tipo de elementos se encuentran dentro de las células de forma reducida y comprenden alrededor del 8 al 14% de la masa total de la misma. Los compuestos mayormente implementados en el proceso de producción de celulosa son: extracto de levadura, polipeptona, sulfato de amonio, caseína, entre otros (**Barrero, 2009; Gómez & Batista, 2006**).

- ***pH (Potencial de hidrógeno)***

Las sustancias en torno a salvaguardar el equilibrio de pH del medio tienen como objetivo permitir el crecimiento adecuado de los microorganismos mediante un nivel de acidez óptimo, el cual debe ser superior a 4 y requiere mantenerse ubicado entre 4,5 y 5,5 a fin de evitar entorpecer el proceso de biosíntesis de celulosa (**Perna, 2013**).

- ***Disponibilidad de oxígeno***

Los microorganismos productores de celulosa como *Komagataeibacter xylinus*, se caracterizan por ser organismos de naturaleza aeróbica estricta; por tanto, el proceso fermentativo para la biogénesis de celulosa necesita de un suministro apropiado de oxígeno. Este elemento juega un papel fundamental dentro del proceso de cultivo de los microorganismos, ya que si se tiene bajos

niveles de oxígeno disuelto en el medio, se produce aturdimiento en torno al desarrollo de la bacteria y por ende se genera una producción deficiente de celulosa (Hwang et al., 1999; Liu et al., 2017).

- **Temperatura**

La biogénesis de celulosa bacteriana requiere de un rango de temperatura específico para no importunar el desarrollo del microorganismo productor. Es por ello que se puede suponer como temperaturas óptimas a los valores comprendidos entre 28 y 32 °C (Navarro, 2018; C.- Pacheco et al., 2004).

1.1.5.3 Matrices para producción de celulosa bacteriana

La celulosa derivada de bacterias consiste en un compuesto crucial de base biológica, que contiene propiedades y características idóneas para un sinnúmero de aplicaciones. Si bien CB otorga múltiples beneficios y ventajas, su alto costo de producción limita su uso a nivel industrial (Esa et al., 2014; Kadier et al., 202).

Múltiples investigaciones recientes asociadas a la búsqueda de alternativas para la optimización de procesos y reducción de costos, han destacado el aprovechamiento de residuos o productos de desecho como sustitutos a las fuentes convencionales (Kadier et al., 2021). Los remanentes agroindustriales poseen un incontable número de sustancias provechosas tales como ácidos orgánicos, azúcares, fibras, proteínas, minerales y vitaminas, las cuales pueden ser de interés para la producción de celulosa, debido a su alto contenido de carbono y nitrógeno (Palacios, 2019; Vélez et al., 2009).

Actualmente, se hallan en curso una diversa variedad de ensayos enfocados en la determinación de la rentabilidad y la factibilidad de la biosíntesis de celulosa a partir de diferentes residuos industriales orgánicos. A continuación se exponen los más relevantes:

Lima et al., (2017), estudiaron el efecto de la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter hanseii* ATCC23769 a partir del aprovechamiento de un residuo agroindustrial. Esta investigación tuvo como finalidad la optimización de los parámetros asociados al proceso de síntesis de celulosa bacteriana en un cultivo

estático enriquecido por jugo de sisal (Extracto de *Agave sisalana*; Residuo agroindustrial derivado de la fabricación de cuerdas). Además, se evaluó la influencia tanto de la concentración inicial de azúcar como del pH, el suministro de nitrógeno y el tiempo de cultivo, mediante CCRD. Como resultado se determinó que el rendimiento de producción de CB en cultivo de sisal, bajo condiciones específicas fue tres veces mayor en comparación al medio de cultivo sintético.

Costa et al., (2017), desarrollaron un estudio enfocado en la “Producción de celulosa bacteriana por *K. hansenii* (UCPI619) utilizando licor macerado de maíz (CLS) como fuente de nutrientes”, a fin de evaluar el uso de residuos orgánicos como alternativa a las fuentes de carbono y nitrógeno convencionales. Dentro del proceso experimental, la biosíntesis de celulosa se produjo a partir de un medio de cultivo conformado por 2,5 % CLS y 1,5 % de glucosa. Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron evidenciar una respuesta favorable al uso de remanentes industriales, debido a que esto dio paso a la obtención de una biopelícula tridimensional, homogénea y compacta, que consta de propiedades y características mejoradas en contraste a las presentes en hidrogeles obtenidos a partir de un medio de cultivo estándar.

Ghozali et al., (2021), realizaron un estudio enfocado en la síntesis y caracterización de celulosa bacteriana producida a partir de *Komagataeibacter xylinus*. Esta investigación utilizó como sustrato el desecho líquido de tapioca, el cual requirió de un calentamiento a una temperatura comprendida entre 70 y 80 °C; para su posterior combinación con azúcar y urea que representan la fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Las biopelículas de celulosa bacteriana obtenidas tras los 10 días de incubación caracterizadas por FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) y SEM (microscopía electrónica de barrido) confirmaron una estructura tridimensional reticulada y compacta. Mientras que la evaluación por XRD (difracción de rayos X) les permitió evidenciar una película pura altamente cristalina. De modo que concluyeron que el residuo de tapioca figura como un medio óptimo para la producción de geles de celulosa.

1.1.6 Metabolismo de lactosa en bacterias

Como se expuso anteriormente, el suero lactosado es uno de los principales residuos de la industria láctea. Por su contenido de nutrientes constituye un excelente medio de cultivo para la obtención de biomasa microbiana y, en este caso particular, CB. El metabolismo de lactosa en bacterias involucra dos vías importantes (Tagatosa- 6p y Leloir), las cuales implican mecanismos complejos aptos para la producción de ácido láctico o a su vez la síntesis de otro tipo de compuestos de interés biotecnológico (exopolisacáridos). En la figura 11, se presenta el esquema completo con respecto al transporte y fermentación de la lactosa en organismos ácidos lácticos (A. Pacheco, 2016).

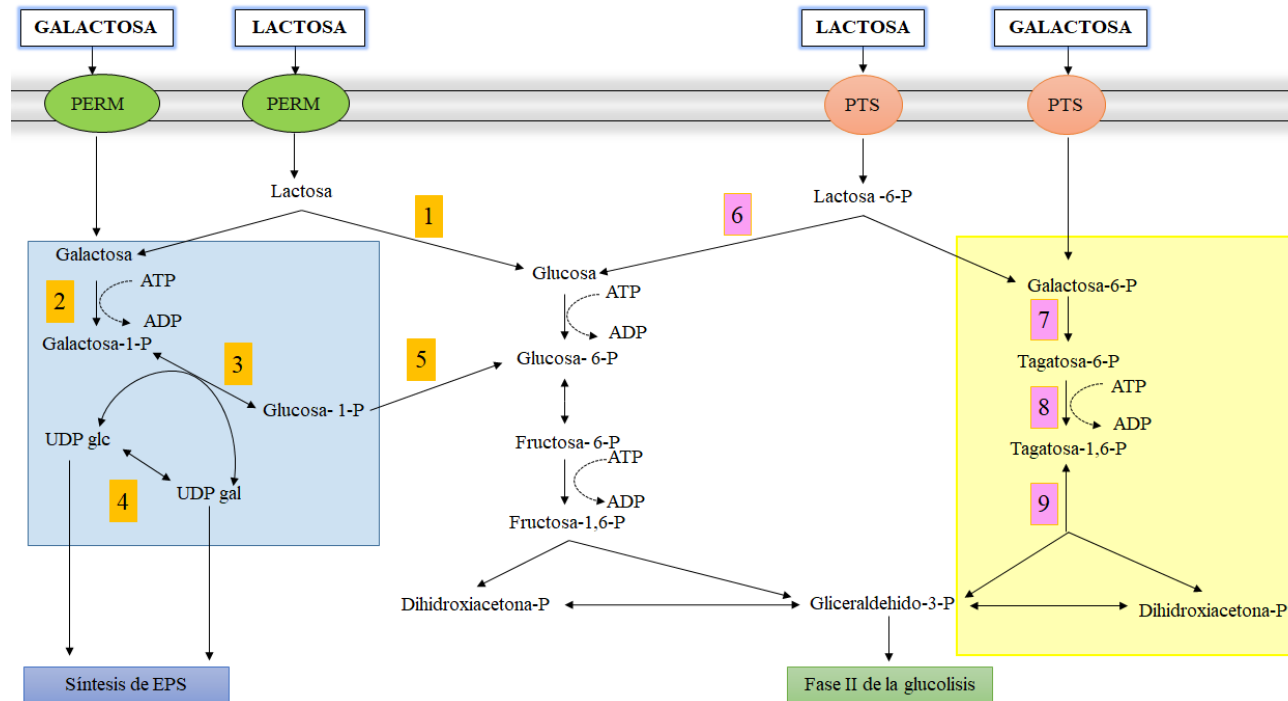


Figura 11. Metabolismo de lactosa. La presente figura expone la ruta de la Tagatosa- 6P (amarillo) y Leloir (azul). Las enzimas participantes en cada proceso son: 1, (β -galactosidasa); 2, (galactoquinasa); 3, (galactosa-1-P-uridiltransferasa); 4, (UDP-glucosa 4- epimerasa);

5, (fosfoglucomutasa); 6, (fosfo- β -galactosidasa); 7, (galactosa fosfato isomerasa); 8, (tagatosa fosfato quinasa); 9, (tagatosa bifosfato aldolasa)]. Enzimas involucradas en la ruta de la tagatosa (tonalidad naranja); Enzimas participantes de la ruta de Leloir (tonalidad rosa). EPS: exopolisacáridos.

(Figura modificada de Yáñez, 2016)

1.1.7 Lactosa como matriz para producción de celulosa

Hoy en día, *K. xylinus* forma parte de múltiples investigaciones a nivel mundial, por su capacidad excepcional para consumir cualquier tipo de sustratos y producir grandes cantidades de celulosa. No obstante, de acuerdo a lo expuesto por **Balseca (2021)**, las cepas de género *Komagataeibacter* son incapaces de consumir lactosa como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana. Esto se demostró a nivel de laboratorio mediante el uso de cultivos suplementados con suero lácteo como única fuente de carbono. Además, a partir de un análisis filogenético se demostró que este tipo de microorganismos carecen del operón *lac* y por ende de los genes *lacZ* y *lacY*, encargados de la producción de la β - galactosidasa y el sistema de transporte lactosa permeasa, evento que justifico la deficiencia en la producción de CB desarrollada experimentalmente a partir de suero de leche.

En contraste a lo expuesto anteriormente, el presente proyecto tiene como finalidad diseñar una ruta metabólica apta para el aprovechamiento de lactosa como sustituto total de la fuente de carbono en *K. xylinus*, con lo cual esto presentara un punto de partida para futuras investigaciones centradas en la optimización y la reducción de costos del proceso de biogénesis de CB a partir de residuos de la industria láctea.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Analizar *in silico* las rutas metabólicas necesarias para sintetizar celulosa bacteriana en *Komagataeibacter xylinus* a partir de lactosa.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar transportadores y enzimas que permiten la absorción y conversión de lactosa en glucosa en bacterias.
- Identificar la presencia de transportadores y enzimas que permiten la absorción y conversión de lactosa a celulosa en *Komagataeibacter xylinus*.
- Determinar las secuencias de los genes a introducir en *Komagataeibacter xylinus* para otorgarle la capacidad de biosintetizar celulosa bacteriana a partir de lactosa.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

2.1.1 Materiales

- Bases de datos
 - BRENDA (The Comprehensive Enzyme Information System/Enzyme Database)
 - DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell Cultures GmbH (Microorganisms Database)
 - GenBank (Nucleotide sequence Database)
 - KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
 - PubMed (Bibliographic Database)
 - Unitprot
- Software Bioinformático
 - ACD/ChemSketch (A Complete Software Package for Drawing Chemical Structures)
 - BLAST (Basic Local Alignment Search Tool/ Nucleotide BLAST)
 - ClustalW (Multiple Sequence Alignment program)
 - MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis program)
- Secuencias
 - Genomas completos de *K. xylinus*
 - Secuencias 16 S de *K. xylinus*
 - Secuencias de ADN y nucleótidos que codifican para:
 - Permeasa lactosa , β -Galactosidasa, Galactoquinasa y Galactosa-1-P-uridiltransferasa

2.1.2 Equipos

- Computador personal
- Router

2.2 Métodos

2.2.1 Recopilación de genes 16S y genomas completos

Para identificar la presencia de genes clave para la absorción y descomposición de la lactosa en glucosa, fue necesario recopilar las secuencias 16S y genomas completos de diferentes cepas de *Komagataeibacter xylinus* mediante el recurso digital “GenBank”, una base de datos de secuencias de nucleótidos perteneciente a NIH, (**National Center for Biotechnology Information, 2014**). Además, se empleó la base de datos de biorecursos “DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell Cultures GmbH” (**Leibniz Institute, 2021**). Cabe mencionar que las secuencias obtenidas a partir de los servidores “NCBI” y “DSMZ” fueron descargadas en formato FASTA, ya que esto permitió el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas y por consiguiente la construcción del árbol filogenético.

2.2.2 Construcción de árbol filogenético

Se implementó secuencias que codifican para la subunidad 16S ribosomal de 40 cepas del género *Gluconacetobacter* de la especie *Komagataeibacter xylinus*, las cuales fueron alineadas mediante el programa informático “ClustalW” (**J. Thompson et al., 2003**). La construcción del árbol filogenético se desarrolló mediante el software “MEGA X”, a partir de los métodos de Neighbor Joining y Máxima Verosimilitud implementando el modelo de sustitución de nucleótidos HKY+G con 1000 réplicas (Bootstrap) y una distribución gamma de 0,17. Esto permitió identificar, la tasa de sustitución (mutación puntual en un tiempo específico), además del nivel de verosimilitud entre entidades biológicas con una descendencia común (**S. Kumar et al., 2018; Tamura et al., 2007**).

2.2.3 Comparación de secuencias genómicas de especies de *Komagataeibacter xylinus*

Para las comparaciones de las secuencias genómicas pertenecientes a las especies de *Komagataeibacter xylinus*, se requirió del análisis de los genomas filogenéticamente más cercanos a aquel de la cepa *DSM 2004*, la cual se encuentra disponible en el cepario perteneciente a la Dra. Liliana Cerda, docente-investigadora

de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.4 Identificación y selección de genes y/o enzimas a introducir en *Komagataeibacter xylinus* para el proceso de biosíntesis de celulosa

Se desarrolló un control exhaustivo en torno a la presencia de los genes productores de las enzimas requeridas en los procesos de biosíntesis de celulosa y el metabolismo de la lactosa en la cepa *E25* (Figura 12), mediante **NCBI-Genome**, (2022). La identificación y selección de genes y/o enzimas a introducir en *K. xylinus*, se realizó a partir de la base de datos “BRENDA”, un recurso digital de acceso libre que consta de una colección de información referente a datos funcionales acerca de una amplia gama de organismos, reacciones metabólicas, enzimas, etc. (Jeske et al., 2019). Esto permitió determinar las enzimas con mejor actividad catalítica a partir de la recopilación y análisis de los valores de K_M y k_{cat} . Es importante señalar que únicamente se reportaron las enzimas obtenidas a partir de organismos procariontas a fin de evitar el entorpecimiento de los procesos metabólicos asociados a la biogénesis de celulosa.

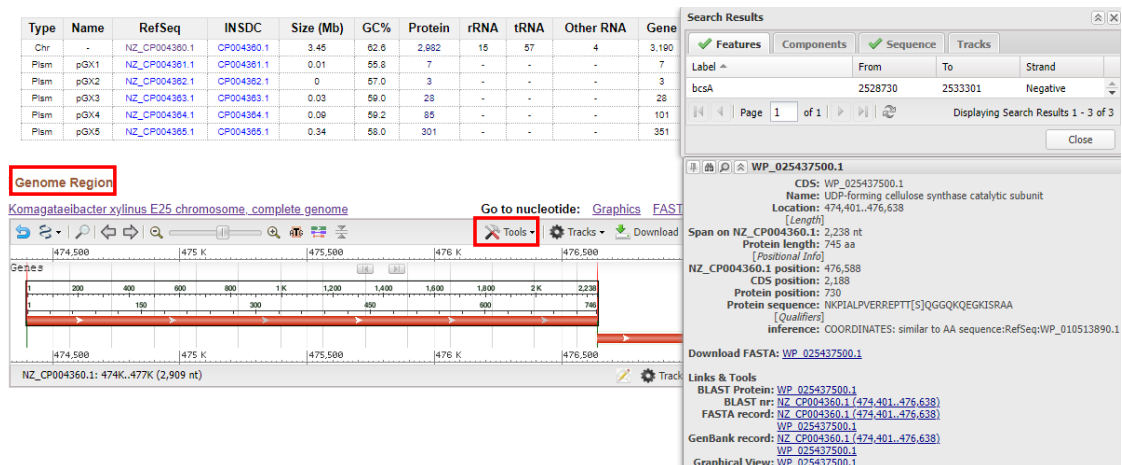


Figura 12. Control de genes presentes en *Komagataeibacter xylinus* E25 a partir del recurso digital NCBI-Genome. La presente figura exhibe la identificación del gen *bcsA* y la información proporcionada por la base de datos.

2.2.5 Desarrollo de ruta sintética para biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de Lactosa

Para el establecimiento de la ruta de biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de lactosa como fuente de carbono, inicialmente se requirió del análisis previo de las rutas metabólicas enfocadas en la biosíntesis de celulosa en *Komagataeibacter xylinus* y la fermentación de lactosa a partir de bacterias ácido lácticas, en donde se identificó las enzimas participantes en los procesos de biosíntesis de celulosa, hidrólisis de lactosa e isomerización de la galactosa a glucosa, además de los canales y sistemas transportadores de sustratos hacia el interior de la célula (**Carreño et al., 2012**). Una vez identificados los genes que participan en estos procesos, se preparó la conexión de módulos y la introducción de enzimas, con el fin de construir una vía metabólica, que permita la conversión total de lactosa a glucosa y por ende la optimización de la producción de CB a partir de lacto suero, similar a lo realizado previamente (**Antonovsky et al., 2016**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Análisis comparativo de secuencias

El punto de partida de este proyecto fue la identificación y análisis de los genes clave en el metabolismo de disacáridos (lactosa) y la biosíntesis de celulosa. Para el análisis comparativo, se realizó la búsqueda de los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S (Anexo 1), así como también las secuencias genómicas de *Komagataeibacter xylinus* a través de la base de datos de nucleótidos “GenBank” de NIH. Como observa en la tabla 8, se encontró 40 diferentes secuencias de ARNr 16S de *K. xylinus*. Por otra parte, se identificó 11 diferentes genomas completamente ensamblados (Anexo 2), de los cuales únicamente 5 cuentan con la ubicación y/o anotación para el gen 16S. Estas 5 secuencias pertenecen a las cepas NBRC 13693, NBRC 15237, LMG 1515, E25 y TJU-D2. Particularmente y conforme a lo expuesto en la literatura, la falta de información en torno a secuencias de genoma completo, se debe a que los estudios moleculares del género *Komagataeibacter* se han limitado a los genes específicos involucrados en la biosíntesis de CB (**K Kubiak et al., 2016; Marič et al., 2020**). En tal sentido, cabe mencionar que no se encontró registro referente al genoma de *K. xylinus* DSM2004 en las bases de datos escrutadas.

Ogino et al., & Katarzyna Kubiak et al, para el año 2011 y 2014 respectivamente, secuenciaron y ensamblaron por completo genomas concernientes a las cepas *NBRC 3288* y *E25* de *K. xylinus*, los cuales hasta ese momento representaban las dos únicas composiciones genómicas descritas de esta especie. Por lo que paralelamente, acorde a lo estipulado por **Ryngajlo et al. (2018)**, se conoce que la mayor parte de estas composiciones permanecen en estado de anotación y/o borrador a manera de lectura mapeada con un grado de calidad poco confiable, lo cual en consiguiente entraña gran dificultad con relación a la comprensión de la base genética del género y corrobora la escasez de información en las diversas bases de datos inspeccionadas.

Tabla 8. *Secuencias 16S y genomas completos de Komagataeibacter xylinus* registrados en GenBank

Strain	Genoma Completo	Código de acceso	
		16S	Secuencia genómica
DSM 46604	-	AJ316552.1	-
JCM 7644	-	AB645737.1	-
JCM 10150	-	AB205219.1	-
NBRC 3288	-	AB680048.1	-
NBRC 13693	Si	AB680481.1	NZ_BANJ01000003.1
NBRC 13772	-	AB680512.1	-
NBRC 13773	-	AB680513.1	-
NBRC 15237	Si	AB680815.1	NZ_BCTP01000001.1
NBRC 16643	-	AB681097.1	-
NBRC 16644	-	AB681098.1	-
NBRC 16670	-	AB681102.1	-
NBRC 16672	-	AB681103.1	-
NBRC 16682	-	AB681108.1	-
DSM 2004	-	GQ240638.1	-
CAV69	-	JQ513828.1	-
dfr1	-	JN619368.1	-
EV11	-	JQ513850.1	-
EVB7	-	JQ513852.1	-
FM883	-	MW757206.1	-
G7-3	-	KF030791.1	-
LMG 1523	-	JF794015.1	-
NCIB 11664	-	NR_036787.1	-
RF	-	MW819869.1	-
SGP8	-	MT250918.1	-
ZUSTBC001	-	MK386709.1	-
LMG 1515	Si	NR_118191.1	NZ_NKUC01000001.1
E25	Si	FJ809929.1	NZ_CP004360.1
C18	-	KY315818.1	-

TJU-D2	Si	MH588135.1	MH588135.1
ATCC 53524	-	KX216689.1	-
ATCC 700178	-	KX216692.1	-
DSM 46603	-	MZ435949.1	-
CV4	-	AB759967.1	-
L96	-	JX283294.1	-
JCM 7644	-	AB645737.1	-
LGM 25	-	JF794012.1	-
OTG001	-	T730006.1	-
KTH 5655	-	KX216694.1	-
ATCC 10245	-	KX216690.1	-
XJL-06-4	-	MH447173.1	-

Nota. Código de acceso de las secuencias en NCBI; (-) No disponible; Cepa de interés DSM 2004 (tonalidad de amarilla); Genomas completos (tonalidad celeste). *La presente tabla presenta el registro e identificación de las secuencias de ARNr 16S y genomas completos de diversas cepas de K. xylinus. Cabe mencionar que de 40 ejemplares únicamente 5 cuentan con una secuencia genómica anotada en NCBI.*

Así pues, en cuanto a los factores de obtención de este homopolímero, se puede mencionar que estos no dependen únicamente del organismo productor, sino también de las condiciones y los componentes nutricionales del medio. Se conoce que este tipo de ejemplares pueden prescindir del uso de glucosa como única fuente de carbono; no obstante, el uso de fuentes alternas influye directamente en la eficiencia del proceso. En comparación con los monosacáridos, fuentes de carbono como la lactosa producen rendimientos ínfimos de celulosa, con lo cual se puede inferir que una de las maneras para que este tipo de bacterias puede producir CB a partir de lactosa, requeriría de la inserción de genes que codifique para la producción de transportadores y enzimas coligados al catabolismo de este tipo de sustratos (Pfeffer et al., 2017; Pradas, 2019).

3.1.2 Análisis filogenético

Mediante la herramienta “ClustalW” se desarrolló un alineamiento múltiple de secuencias en base a las composiciones previstas en formato FASTA de los 40 ejemplares de referencia, basados en el gen ARNr 16S. La implementación del gen de

distribución Gamma discreta de 0,17 (Tasa entre sitios; Distribución de probabilidad *a priori* de tasas de mutación), que permitió incrementar el ajuste entre los datos de las secuencias y los modelos de sustitución (García, 2015; Yang, 1996).

Para la determinación del modelo evolutivo, se identificó y eligió el patrón de sustitución de nucleótidos más congruente, de los 24 elementos enlistados en el Anexo 4. La Tabla 9 exterioriza los resultados obtenidos del análisis de secuencias con relación a los ajustes de probabilidad para los 3 modelos más asequibles, teniendo en cuenta dos constituyentes fundamentales de categorización y evaluación. Estos son: el criterio de información Bayesiano (BIC) como medida del ajuste de datos y el criterio de Akaike, corregido (AICc; corrección de muestras finitas), a modo de un factor de calidad del estándar estadístico. Los valores BIC oscilaron en un rango aproximado de 6936.97 y 7031.19. Mientras que el factor estadístico, fluctuó entre 6211.56 y 6350. Es así que, cuanto menor son las puntuaciones citadas, más significativo es el ajuste del modelo (Arbiza et al., 2011; W. Li & Nyholt, 2001; Vrieze, 2012).

En este particular, se eligió a Hasegawa–Kishino–Yano con variación en la tasa de distribución gamma (HKY+G) como el patrón evolutivo más adecuado para la reconstrucción filogenética (Anexo 5), a pesar de no manifestar diferencias significativas en comparación con los modelos de sustitución TN93+G (Tamura–Nei 93+G) y TN92+G (Tamura–Nei 92+G).

Tabla 9. Modelos de sustitución de nucleótidos

Modelo	BIC	AICc	+G	R
HKY+G	6936.972273	6211.564218	0.17048943	1.53
TN93+G	6937.630048	6203.378787	0.17831488	1.52
T92+G	6940.746426	6233.025019	0.17420300	1.51

Nota. Criterio de información Bayesiano (BIC); Criterio de Akaike, corregido (AICc); Distribución Gamma (+G); Sesgo de transición/transversión (R). De los 24 modelos evaluados, se consideró los 3 modelos de ajuste más adecuado, mismos que manifestaron puntuaciones BIC y AICc bajas en comparación a los demás enlistados de forma ascendente en el Anexo 4.

La afiliación de las cepas *K. xylinus* mostró una estrecha proximidad entre entidades, dada por la alta homología de secuencias y ratificada por el porcentaje de divergencia intraespecífica relativamente ínfimo reportado (1%). En general, los diagramas de filogenia esbozados simultáneamente manifestaron topologías análogas; sin embargo, presentaron variaciones explícitas asociadas a la interrelación de los taxones. Es importante señalar que, los valores numéricos en los puntos de ramificación, expresan la probabilidad y/o grado de confianza de los nodos con respecto a la prueba de Bootstrap con 1000 réplicas, hecho que exteriorizó el estado más probable de cada interacción con propósito de obtener esquemas de máxima probabilidad logarítmica.

El diagrama filético por el método probabilístico de máxima verosimilitud (figura 14), permitió agrupar los 40 taxones en 2 clados principales, conforme a la paridad de las secuencias. De acuerdo a la diversificación de las cepas; el primer grupo consto de dos sub ramales, donde las unidades taxonómicas operacionales (UTOs) ostentan eminente contigüidad. Mientras que el segundo, presenta a C18 como outgroup y/o taxón más distante. Según los resultados obtenidos, DSM 2004 manifestó una notable cercanía evolutiva respecto a las cepas TJU-D2, E25, ZUSTBC001, XJL0-06-4, G7-3, CAV69, LGM 1523, DSM 46603, LGM 25 y OTG001. No obstante, el soporte estadístico (Bootstrap), exteriorizo un resultado fortuitamente inferior (8 %) en comparación al valor teórico óptimo (>70%), lo cual planteo una correlación inconsistente (**Felsenstein, 1981; Lin et al., 2016**).

Como análisis complementario, se efectuó la estimación filogenética por el método de distancia Neighbor-Joining, el cual acorde a lo estipulado por **Saitou & Nei, (1987)**, permitió la observación de las distancias evolutivas acorde al grado de similaridad y/o variabilidad intraespecífica. En la figura 15, el diagrama confirmó la diversificación de los taxones en dos grupos principales, donde la primera agrupación corroboró los resultados del método de Máxima verosimilitud en cuanto a la afiliación de las cepas bajo un soporte estadístico correspondiente al 98%. Esto a su vez, concuerda con estudios realizados por **Balseca, (2021)** y **Gullo et al., (2019)**, donde es evidente la alta cercanía evolutiva entre las cepas previamente señaladas.

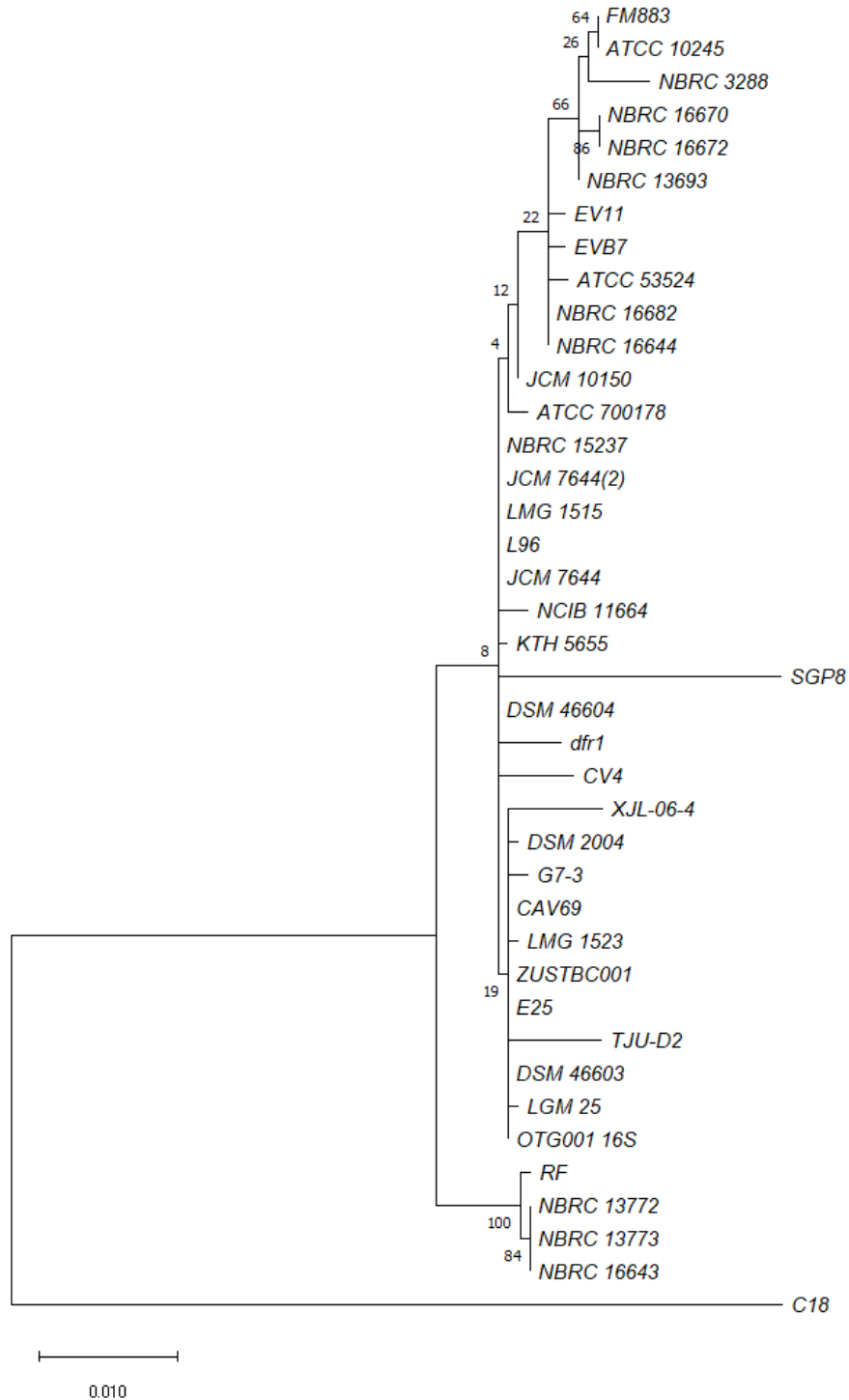


Figura 14. Árbol filogenético inferido por el método probabilístico “Maximum Likelihood” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de *K. xylinus*. Filograma desarrollado a partir del software bioinformático “MEGA X” con el modelo de sustitución de nucleótidos HKY+G (D. gamma 0,17). Los valores numéricos en los puntos de ramificación exteriorizan la probabilidad y/o grado de confianza de cada nodo con respecto a la prueba de Bootstrap con 1000 repeticiones. La barra de escala (0,010) representa la tasa de divergencia intraespecífica de secuencia (Distancia Evolutiva).

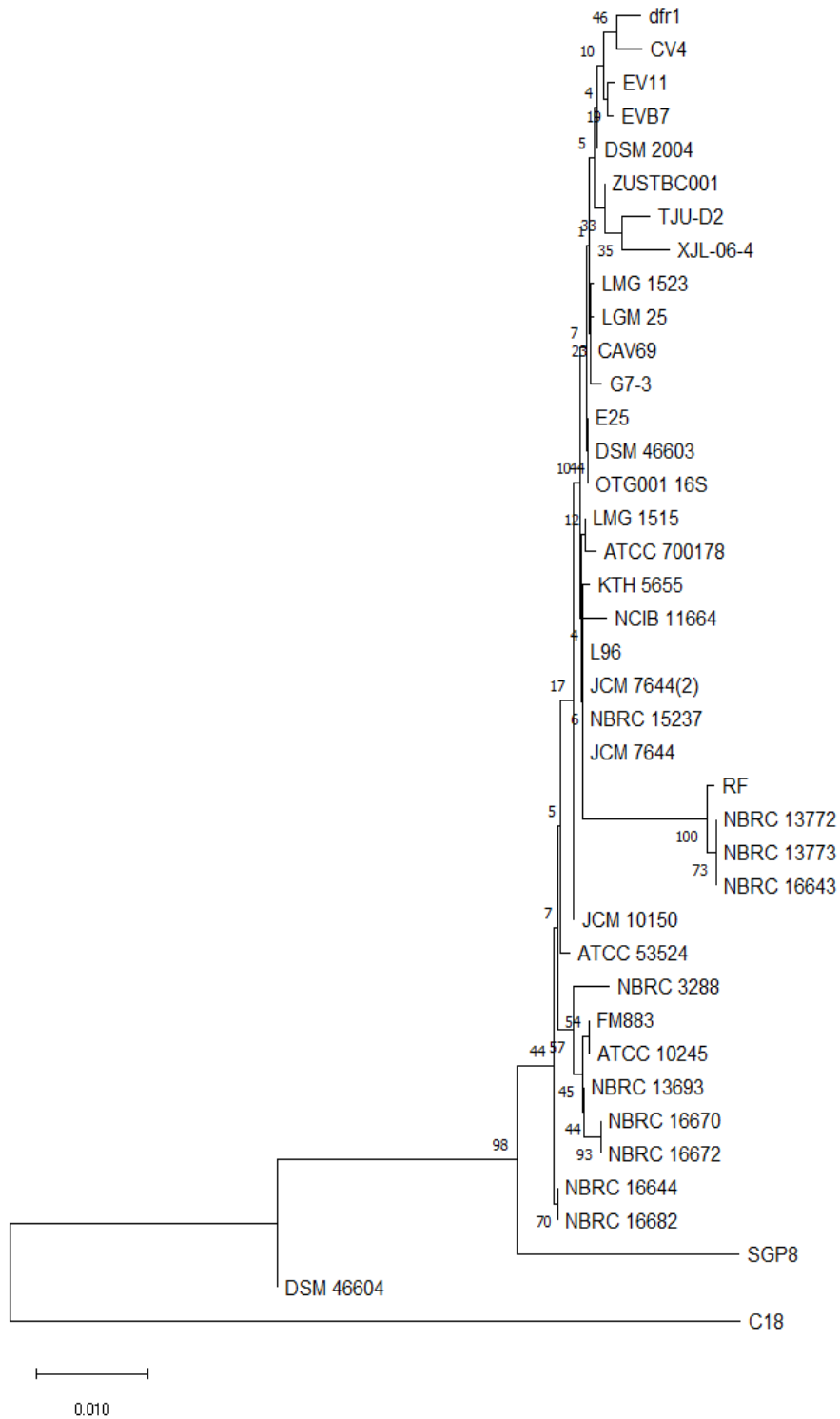


Figura 15. Árbol filogenético inferido por el método de distancia “Neighbor-Joining” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de *K. xylinus*. Filograma desarrollado a partir del software bioinformático “MEGA X”. Los valores numéricos en los puntos de ramificación exteriorizan la probabilidad y/o grado de confianza de cada nodo con respecto a la prueba de Bootstrap con 1000 repeticiones. La barra de escala (0,010) representa la tasa de divergencia intraespecífica de secuencia (Distancia Evolutiva).

Finalmente, se seleccionó dos de las cinco cepas que reportan genoma completo: TJU-D2 y E25, acorde a su proximidad con la cepa de interés. La figura 16 muestra el filograma estimado mediante el método de máxima verosimilitud, en conjunto al modelo de sustitución de nucleótidos HKY. La reconstrucción reveló una estrecha filiación entre DSM 2004 y los organismos señalados, la cual acorde a **Marič et al., (2020)** es ratificada por la cercanía evolutiva, el porcentaje de identidad de secuencia (99,2%) y el soporte estadísticos de ajuste (100%).

Con respecto a la determinación del espécimen filogenéticamente más cercano, se eligió a E25 como cepa homóloga a DSM 2004, dado que hasta ese instante ostentaba mayor cantidad de información registrada en las bases datos. Cabe mencionar que acorde al porcentaje de divergencia (0,01%), las secuencias no exteriorizaron un polimorfismo significativo, lo que permitió inferir un bajo grado de diferenciación (**S. Kumar et al., 2018; Tamura et al., 2007**).



Figura 16. Árbol filogenético inferido por el método probabilístico “Maximum Likelihood” procedente del análisis de secuencias de ARNr 16S de las cepas *K. xylinus* TJUD2, E25 y DSM 2004. Filograma desarrollado a partir del software bioinformático “MEGA X” con el modelo de sustitución de nucleótidos HKY ($D. \gamma: n/a$). Los valores numéricos en los puntos de ramificación exteriorizan la probabilidad y/o grado de confianza de cada nodo. La barra de escala (0,00010) representa la tasa de divergencia intraespecífica de secuencia (Distancia Evolutiva).

3.1.3 Análisis y selección de rutas metabólicas

Se realizó el análisis de los procesos de absorción y conversión de lactosa en bacterias ácido lácticas (BAL) y ácido acéticas (BAA), con el fin de identificar la maquinaria catalítica involucrada en el metabolismo de disacáridos y la biosíntesis de CB. Las redes metabólicas fueron adquiridas de la base de datos “KEGG” y “NCBI”, específicamente de **Kanehisa Laboratories, (2021)**, e investigaciones preliminares desarrolladas por **Yáñez, (2016)** y **Cheng Zhong et al., (2013)**.

El genoma de *Komagataeibacter xylinus* E25 está constituido por 1 cromosoma y 5 plásmidos. El tamaño y contenido de GC de las secuencias se reportan en el Anexo 6. Se han descrito un total de 3701 genes, entre ellos 50 permeasas, 13 simportadores y 50 transportadores. Los detalles de anotación yacen en la base de datos NCBI en torno al código de acceso ASM55076v1 y/o CP004360.1 (**KEGG, 2022b; Katarzyna Kubiak et al., 2014; NCBI, 2022**).

La figura 17 muestra la red metabólica de biosíntesis de celulosa en BAA particularmente en cepas *K. xylinus*. La vía manifiesta el desarrollo de cuatro actividades enzimáticas fundamentales, adjudicadas en dos fases; I) conversión de la fuente de carbono, y II) formación y deyección de CB, semejante a lo descrito por **Ross et al., (1991)** y **Lustri et al., (2015)** (Figura 17a; Anexo 7). La fase I, exhibe la intervención de las enzimas 1, 2 y 3, correspondientes a la glucoquinasa (EC 2.7.1.1; Conversión de la glucosa al intermediario catalítico Glucosa – 6 – P), fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2; Isomerización de la Glucosa – 6 – P a Glucosa – 1 – P) y UTP – glucosa – 1 – fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.9; Síntesis de UDP – Glucosa), en orden. Así mismo, los procesos concernientes a la etapa II ostentan la participación del complejo catalítico celulosa sintasa (4), constituido por las subunidades proteicas BcsA, BcsB, BcsC y BcsD (Figura 17b, Operón *bcsI*; EC 2.4.1.12; Polimerización, translocación y ensamblaje de CB) y activado por la proteína de unión CDGMP (c – di – GMP). Las moléculas de señalización c – di – GMP, son codificadas por los gen *cdg* (**Liu et al., 2018a; Morgan et al., 2014**).

La tabla 10 aborda una descripción breve referente a las proteínas partícipes de la biogénesis de celulosa, identificadas en el genoma de *K. xylinus* E25. Se detalla como aspectos relevantes: gen, longitud y código de acceso de la secuencia.

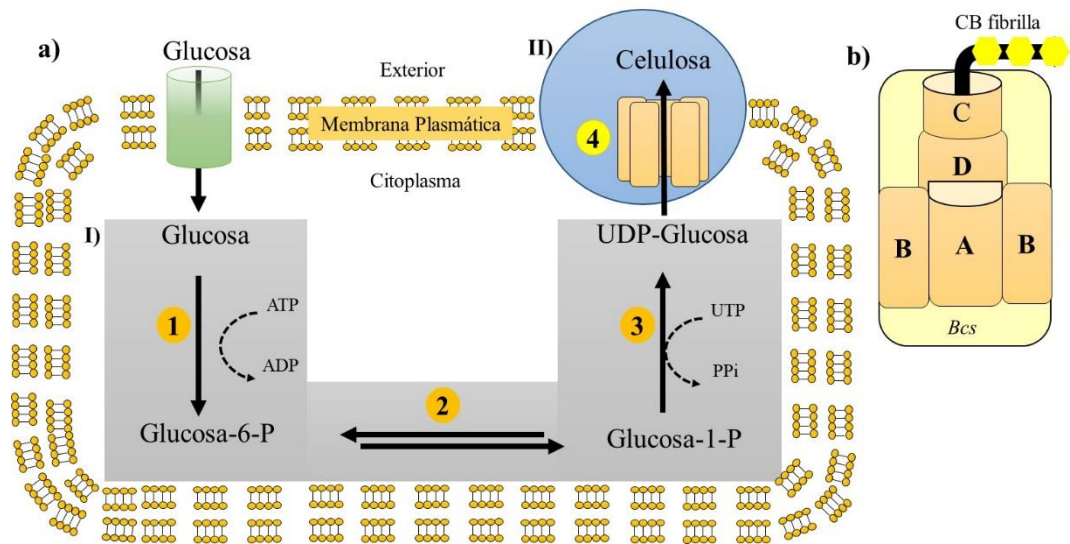


Figura 17. Esquema general de biosíntesis de celulosa en bacterias ácido acéticas con respecto a cepas *K. xylinus*. Fuente de carbono: Glucosa. **a)** La ruta se descompone en dos etapas: I) conversión de la fuente de carbono a UDP- Glucosa (gris), y II) formación y deyección de celulosa (azul). Las enzimas participantes en cada fase son: 1, (glucoquinasa); 2, (fosfoglucomutasa); 3, (UTP – glucosa – 1 – fosfato uridiltransferasa) y 4, (Complejo catalítico celulosa sintasa). Enzimas fase 1 tonalidad naranja. Enzimas fase 2 tonalidad amarilla. **b)** Celulosa sintasa.

Tabla 10. Proteínas y/o genes que interceden en el proceso de biosíntesis de Celulosa bacteriana, identificadas en el genoma de *K. xylinus* E25

Etapa	Maquinaria catalítica	Gen	Longitud (aa)	Código de acceso
I	Glucoquinasa	<i>glk</i>	305	AHI24639.1
	Fosfoglucomutasa	<i>pgm</i>	555	WP_025438550.1
	UDPG pirofosforilasa	<i>galU</i>	289	WP_025438585.1
II		<i>bcsA</i>	745	AHI24410.1
	Celulosa sintasa	<i>bcsB</i>	605	AHI26282.1
	(Operón <i>bcsI</i>)	<i>bcsC</i>	983	WP_025439172.1
		<i>bcsD</i>	156	WP_025437503.1

Nota. Aminoácidos (aa); Código de acceso referente a la base de datos “NHI”. El mecanismo involucra tanto enzimas individuales como proteínas reguladoras y complejos catalíticos. La tabla muestra los genes que codifican la maquinaria catalítica necesaria para la biosíntesis de CB. Estos fueron identificados en el genoma de *Komagataeibacter xylinus* E25.

El esquema general del catabolismo de lactosa en BAL, se observa en la figura 18. En este se confronta dos rutas: Leloir y Tagatosa – 6 – P, afines a organismo homo y heterofermentativos, respectivamente. Para cada vía, se identificó la maquinaria catalítica encargada tanto de la absorción como conversión de lactosa (Anexo 8).

El análisis de Leloir, reflejó la presencia de un sistema de intercambio (lactosa permeasa; PERM) y 4 actividades catalíticas conexas a la hidrólisis de lactosa e isomerización de la galactosa a glucosa – 6 – P. En la red, se puede distinguir la traslación de lactosa por un simportador (permeasa), de manera semejante al patrón enzima – sustrato. La enzima es una proteína politópica integral, que contiene un único sitio de unión y 12 hélices α -transmembrana (código PDB: 6vbg). En general, el sistema es codificado por el gen *LacY* (Kaback & Guan, 2019; Poolman, 1993).

Abramson & Wright, (2021), reportaron una comparación entre los simportadores *LacY* y *vSGLT*, encargados del transporte activo de azúcares en organismos procariotas. El estudio detalló la estructura, función y propiedades cinéticas de cada proteína. Los resultados exteriorizaron una elevada especificidad de *LacY* por la lactosa, derivada de las interacciones entre la cadena lateral (Trp – 256, Glu – 269, His – 322 y Asn – 272) y el anillo galactopiranosido (**H. Kumar et al., 2015**). Simultáneamente, **Araujo et al., (2007)**, especificaron su importancia como un factor limitante en la determinación de la velocidad de hidrólisis de disacáridos.

Por otro lado, se observó la intervención de las enzimas β - galactosidasa (EC 3.2.1.23; Hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa), galactoquinasa (EC 2.7.1.6; Fosforilación de la galactosa a galactosa 1 – P), galactosa – 1 – P uridiltransferasa (EC 2.7.7.12; Conversión de galactosa 1 – P a glucosa 1 – P) y fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2; Transferencia de fosfato del carbono 1 al 6, glucosa 1 – P a glucosa 6 – P), las cuales son alusivas a los numerales 1, 2, 3 y 5 del modelo metabólico ilustrado.

A diferencia de Leloir, Tagatosa – 6 – P ostenta un sistema de transporte fosfoenolpiruvato lactosa fosfotransferasa (PTS) en conjunto a 4 actividades catalíticas. Se evidenció que el sistema PTS transporta y fosforila la lactosa, conforme a lo ocurrido en bacterias homofermentativas. El Antiportador es dependiente de la gradiente de protones y/o cationes. El proceso de hidrólisis se asemeja al previamente mencionado; sin embargo, presenta una corriente directa en torno a la conversión de

la galactosa a gliceraldehído 3 – P. Las enzimas participes del catabolismo son: fosfo – β – galactosidasa (6; EC 3.2.1.85; Hidrólisis del disacárido lactosa 6 – P en glucosa y galactosa 6 – P), galactosa 6 – P isomerasa (7; EC 5.3.1.26; Isomerización de galactosa 6 – P a Tagatosa 6 – P), tagatosa 6 – P quinasa (8; EC 2.7.1.101; Cataliza la reacción: $ATP + D - Tagatosa - 6P \rightleftharpoons ADP + D - Tagatosa 1,6 - bifosfato$) y tagatosa – bifosfato aldolasa (9; EC 4.1.2.40; Escisión de Tagatosa 6 – P en gliceraldehído 3 – P y dihidroxiacetona – P).

Finalmente, se evidencio que de la amplia gama de reacciones efectuadas por *K. xylinus*, algunas actividades catalíticas que rodean el metabolismo de disacáridos se encuentran ausentes. Considerando los antecedentes antes expuestos, se observó que las enzimas nativas de Leloir y Tagatosa-6P, pueden catalizar los procesos remanentes (Figura 18). Manualmente, se llevó a cabo la identificación de las reacciones efectuadas por cada enzima, conforme al protocolo de **Feist et al., (2011)**. En atención a lo cual, la reconstrucción precisa de cuatro proteínas recombinantes, esto con el objetivo de proveer a E25 el requisito mínimo de genes, similar a lo previamente realizado (**Antonovsky et al., 2016; Battad et al., 2004**). Con esta premisa, se optó por un sistema de transferencia y tres enzimas participes de la ruta de Leloir. Producto de esta selección, el simportador Lactosa-permeasa y las enzimas EC 3.2.1.23, EC 2.7.1.6 y EC 2.7.7.12, proteínas estudiadas a detalle en BAL.

Heng Zhang et al., (2017), modificaron una red a escala del genoma de la cepa RZS01 de *K.nataicola*, mediante un análisis de restricciones y la evaluación de vías intracelulares. Los resultados permitieron evidenciar un total de 711 genes, 2014 reacciones y 2035 metabolitos, de los cuales 101 son genes necesarios para el crecimiento y 8 genes tienen objetivo potencial para producir CB.

Rezazadeh et al., (2020), demostraron la reconstrucción de un modelo metabólico en *K. xylinus* cepa E25, con la finalidad de prever la producción de CB y subproductos. La ruta exteriorizó: 783 reacciones metabólicas, 640 genes y 865 metabolitos, en conjunto a un FBA correspondiente a una tasa de $1,9 \text{ mmol } gDCW^{-1} h^{-1}$ para CB. El estudio enfatizó un proceso de optimización *in silico*, de alta calidad, conforme al protocolo de **Thiele & Palsson, (2010)**.

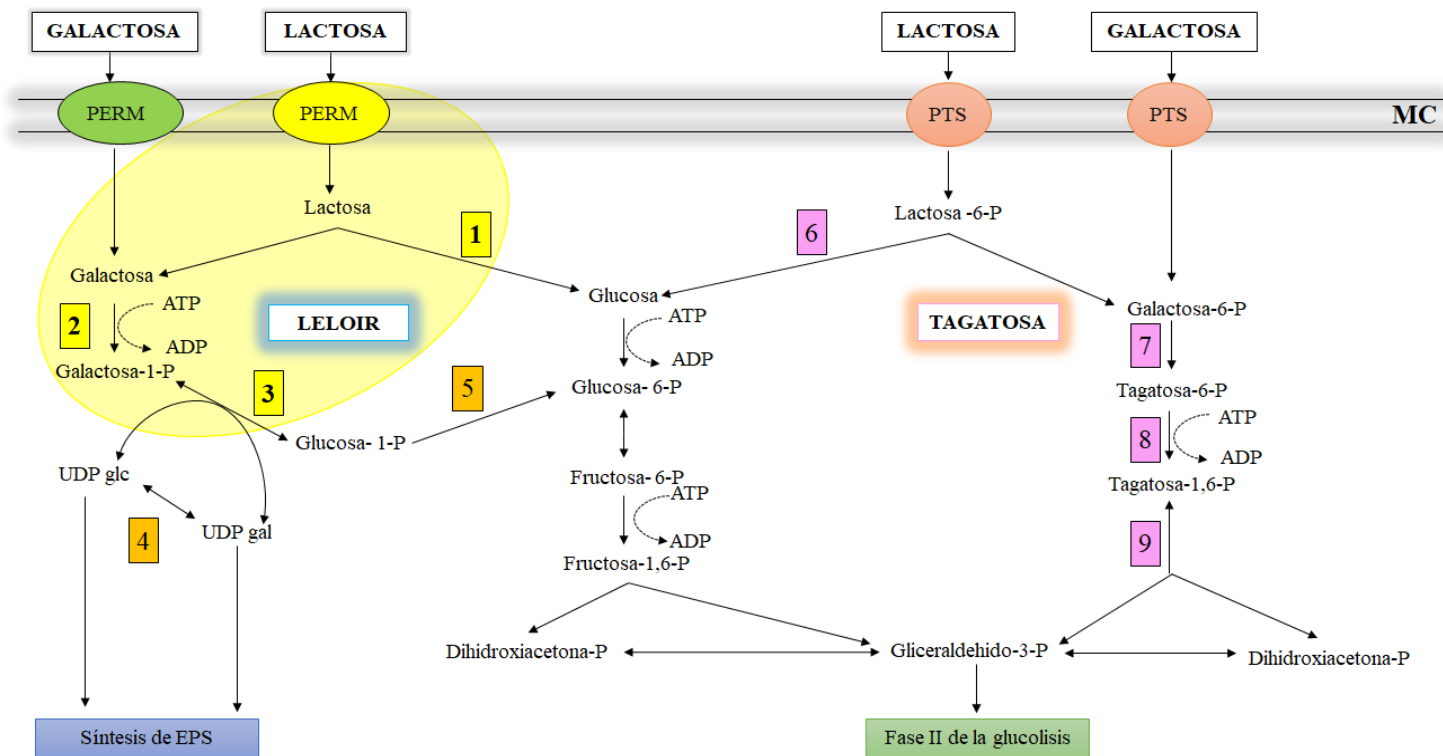


Figura 18. Esquema general de transporte y metabolismo de lactosa en bacterias ácido lácticas. Evaluación de Ruta de Leloir y Tagatosa-6P. Análisis de las enzimas necesarias para completar el módulo de producción de celulosa bacteriana en *K. xylinus* a partir de lactosa. Se resalta la maquinaria enzimática requerida en las fases de transporte e hidrólisis (Amarillo). **Leloir:** [Sistemas: PERM; Enzimas: 1. β -galactosidasa, 2. galactoquinasa, 3. galactosa – 1 – P uridiltransferasa (Amarillo); 4. UDP – glucosa – 4 – epimerasa y 5. fosfoglucomutasa (Naranja; No relevantes)]; **Tagatosa 6-P:** [Sistema: PTS ; Enzimas: 6. P – β – galactosidasa, 7. galactosa 6 P – isomerasa, 8. tagatosa 6 – P quinasa y 9. Tagatosa bifosfato aldolasa (Rosa; No relevantes)].

3.1.4 Búsqueda de genes y selección de enzimas óptimas para la biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de lactosa

Se identificó la presencia de enzimas y transportadores participes del metabolismo de disacáridos. Mediante NCBI-Genome, (2022), se realizó la búsqueda de los genes vinculados al catabolismo de lactosa en el genoma de *K. xylinus* E25 (código NZ_CP004360.1). El proceso fue acotado a la identificación de las proteínas seleccionadas en el punto 3.1.3. Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 19 y 20.

Para la verificación y aserción de la confiabilidad del ensayo, se adicionó un control positivo referente a los genes responsables de la biosíntesis de BCAAs (Anexo 9); constituido a través de los genes *ilvB* (código WP_025437140.1), *ilvC* (código WP_025437142.1) e *ilvN* (código WP_025437141.1) inherentes al operón *ilv-leu* (Figura 19a, b y c).

Una vez finalizada la comprobación, se realizó un testeo bioinformático conexo a la identificación de los genes de interés. La figura 20, resume el rastreo y respuesta. En este particular, se evidencio un resultado negativo en contraste con el estándar (Figura 20e), y como se esperaba la ausencia total del grupo experimental (*lacY*, *lacZ*, *galK* y *galT*). Corroborando así la incapacidad de *K. xylinus* para metabolizar la lactosa, dada la ausencia y/o presencia de genes inoperativos, descrita por estudios independientes tomados como precedentes para el desarrollo de esta exploración genómica (Balseca, 2021; Battad et al., 2004; Tsouko et al., 2015).

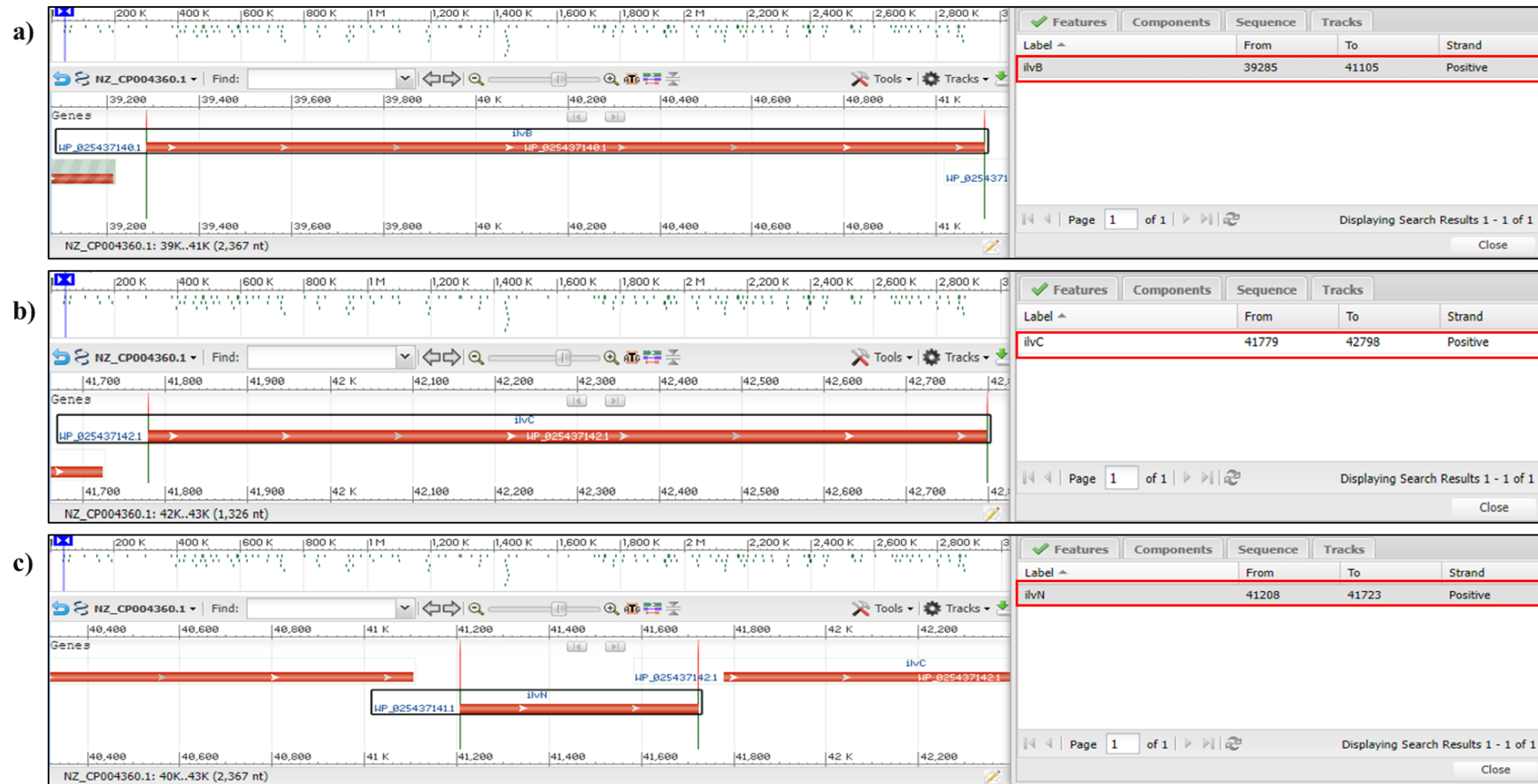


Figura 19. Búsqueda de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en el genoma *K.xylinus* E25; **a)** *gen ilvB*, **b)** *gen ilvC* y **c)** *gen ilvN*. La figura exhibe los genes implementados como control positivo para la verificación de resultados. Estos codifican para: Subunidad grande-acetolactato sintasa, Cetol-ácido reductoisomerasa y Subunidad pequeña-acetolactato sintasa, respectivamente. La herramienta proporciona: gen, código, secuencia, ubicación, etc.

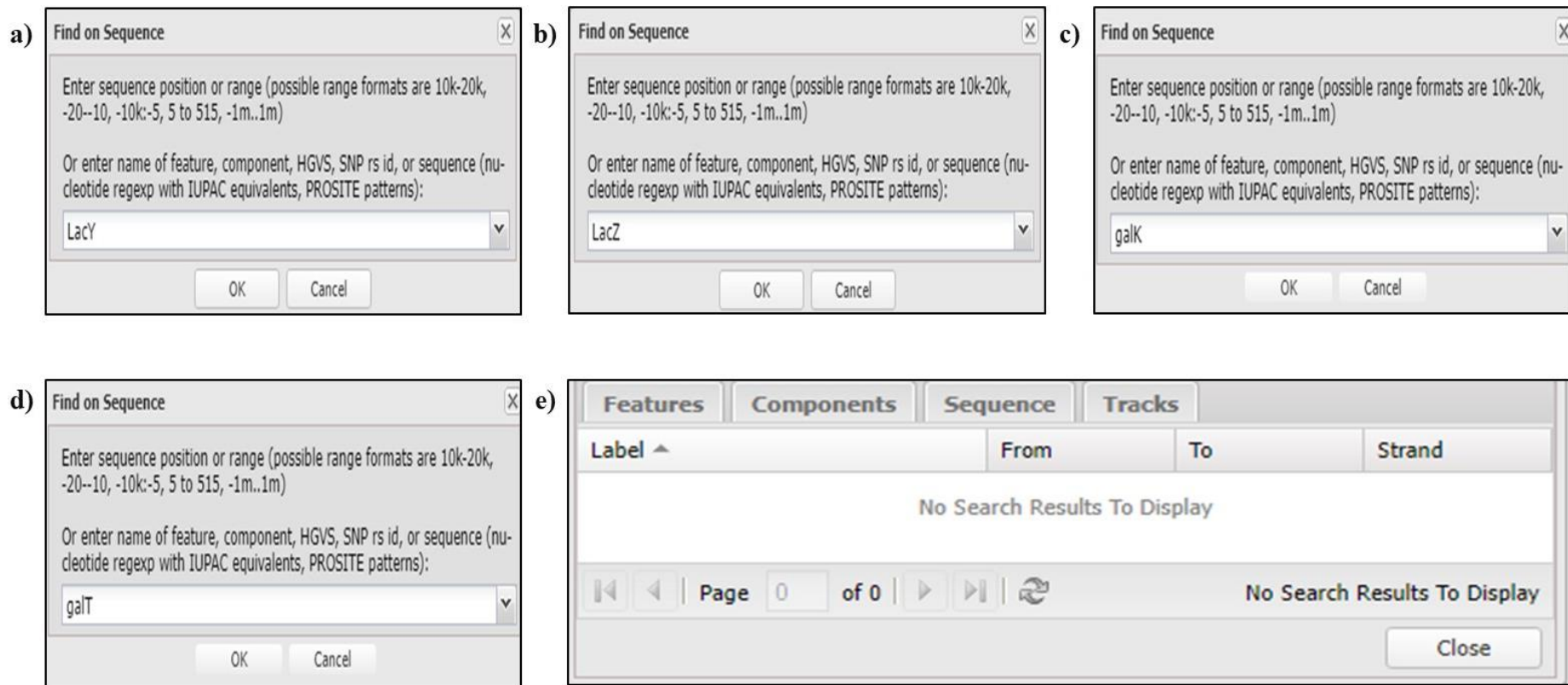


Figura 20. Búsqueda de genes involucrados en el metabolismo de la lactosa en el genoma de *K.xylinus E25*; a) *gen LacY*, b) *gen LacZ*, c) *gen galK*, d) *gen galT*. El panel e, detalla el resultado obtenido tras el testeo bioinformático relacionado a la exploración del genoma. La respuesta negativa exterioriza la incapacidad del organismo para metabolizar lactosa, dada por la ausencia de los genes seleccionados.

A partir de los resultados obtenidos en la búsqueda e identificación de genes, se efectuó un análisis comparativo, con objeto de seleccionar las enzimas de mayor eficiencia. Junto con dicha información se analizó la actividad enzimática. Los datos acorde a cada enzima fueron organizados de manera ascendente, en función de los parámetros cinéticos K_m y K_{cat} , tal como se presenta en las tablas 12 a 14.

Los genes para ser expresados, deben ser optimizados (**Lara, 2011**). Dentro de la selección de los genes afines a la expresión heteróloga de proteínas en *K. xylinus*, se consideró ciertos preceptos implícitos en diversos protocolos de transformación genética. Las directrices varían afín a cada organismo. En cuanto a genes eucariotas, se detectaron los siguientes requerimientos: i) Revisión de intrones y exones, para supresión de los fragmentos de ADN no codificante y por ende la obtención de ADN complementario; ii) Optimización de codones, adaptación de la secuencia con propósito de maximizar el nivel expresión proteico; iii) Remoción de péptido señal, exclusión de un fragmento de péptidos implementados como guía para la ubicación de la proteína; e iv) Identificación de modificaciones postraduccionales, referente a la determinación de cambios químicos después de la síntesis, etc. (**Bashiri & Baker, 2014; Lammertyn & Anne, 1997; Parenteau et al., 2019; von Heijne, 1990; Zerbs et al., 2009**).

Con objeto de garantizar la eficiencia del proceso y evitar complicaciones, se descartó el uso de genes eucariotas. En este particular, se decidió seleccionar las proteínas de menores requerimientos, eligiendo así únicamente las enzimas procedentes de organismos procariotas con una efectividad considerablemente alta.

3.1.4.1 Permeasa lactosa (Lactosa/H⁺)

La permeasa lactosa es un simportador de la MFS (**Kaback, 2015**), responsable de la translocación de solutos, con la incorporación concomitante de iones H⁺ (**Bazzone et al., 2022; Kaback & Guan, 2019; Rigalli, 2019**). Si bien el sistema permite el transporte activo de sustratos, su función no se asocia a la catálisis de reacciones metabólicas, por lo cual no se considera una enzima. Con este precedente, no se realizó un análisis comparativo de genes, y en consiguiente se optó por seleccionar directamente al gen *lacY* de *Escherichia coli* K-12 C3026.

En este sentido, se recopiló la secuencia peptídica y nucleotídica del gen *lacY*. Como se ilustra en la figura 21a y b, las composiciones constan de un tamaño aproximado de 417 aa y 1254 nt, respectivamente. Los detalles de anotación yacen en el recurso digital “GenBank” alrededor del código de acceso AMH33676.1 y NZ_CP014272.1: 336589-337842. El peso molecular y los valores de cinética (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) teóricos de la proteína (Lactosa/ H^+) recaen en 46,50 kDa , 0,62 mM y 191 nmol/min/mg (código UniProt; P02920), en orden y acorde al uso de lactosa como sustrato.

- a) MYYLKNTNFWMFGLFFFFYFFIMGAYFPFFPIWLHDINHISKSDTGIIFAAISLFSLLFQPLFGLLSDKL
GLRKYLLWIITGMLVMFAPFFIFIFGPLLQYNILVGSIVGGIYLGFCFNAGAPAVEAFIEKVSRRSNFEF
GRARMFGCVGWALCASIVGIMFTINNQFVFWLGSICALILAVLLFFAKTDAPSSATVANAVGANHS
AFSLKLALFLRQPKLWFLSLYVIGVSTYDVFDDQFANFFTSFFATGEQGRVVFVGYVTMMGELLNA
SIMFAPLIINRIGGKNALLLAGTMSVRIIGSSFATSALVVLKTLHMFVFPFLVGCVKYITSQFEVR
FSATYLVCFKFFKQLAMIFMSVLAGNMYESIGFQAYLVLGLVALGFTLISVFTLSGPGPLSLLRRQV
NEVA
- b) TTAAGCGACTTCATTCACCTGACGACGCAGCAGGGAAAGCGGGCCGGGGCCGCTAAGCGTGAA
CACGGAAATTAAGGTGAAGCCAGCGCCACCAGACCCAGCACCAGATAAGCGCCCTGGAAACC
GATGCTTTTCATACATATTGCCCGCCAGTACAGACATAAAAATCATCGCCAGTTGCTTAAAGAAGC
AGAAACAGACCAGATAAATCGTCGCTGAAAAACGCACCTCAAACCTGGCTGGTAATATATTTAAA
GCAGCCCACCAGCAGGAACGGTACTTCAAACATATGCAGCGTTTTTCAGAATAACCACTTCCAGC
GCTGAGGTGGCGAACGATGAGCCAATAATACGTACAGACATAATAGTCCAGCCAGCAGCAGGG
CGTTTTTCCCACCGATGCGATTAATGATCAGTGGCGCAAAGAACAATAATCGAGGCGTTAAGTAAT
TCGCCATTGTCGTTACGTAGCCAAATACCCGCGTACCCTGTTACCCGGTAGCAAAGAACGAAG
TAAAGAAATTAGCAAACCTGTTGGTCAAAAACATCGTAGGTGCAGGAAACGCCAATAACATACAG
TGACAAAAACCACAGTTTTGGCTGTCTGAACAGTTCAGTGCCAGCTTAAGGCTAAATGCCGAA
TGTTGGCACCTACCGCATTGGCAACCGTGGCAGAAGAGGGCGCATCCGTTTTGGCGAAAAAG
AGTAAAACGGCGAGGATGAGTGCACAGCCAGAGCCCAGCCAGAAAACAACTGATTATTGATG
GTGAACATGATGCCGACAATCGAGGCACACAGCGCCCAGCCAACACAGCCAAACATCCGCGCG
CGACCAAATTCGAAATTAAGTGCACGGCTGACTTTCTCAATAAATGCCTCTACTGCTGGCGCACC
GGCGTTAAAACAAAAGCCTAGATAAATACCACCAACAATCGATCCTACTAAAATGTTGTATTGTA
ACAGTGGCCCGAAGATAAAAATAAAGAACGGCGCAAACATCACTAACATGCCGTAATAATCCA
CAGCAGGTATTTGCGCAGCCGAGTTTGTGAGAAAGCAGACCAAACAGCGGTTGGAATAATAGC
GAGAACAGAGAAATAGCGGCAAAAATAATACCCGTATCACTTTTGTGATATGGTTGATGTCATG
TAGCCAAATCGGGAAAAACGGGAAGTAGGCTCCCATGATAAAAAAGTAAAAGAAAAAGAATAA
ACCGAACATCCAAAAGTTTGTGTTTTTAAATAGTACAT

Figura 21. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos del simportador Lactosa-Permeasa tomado de *Escherichia coli* K-12; La figura compendia las secuencias extraídas del recurso digital “GenBank” de la base de datos de nucleótidos “NHI”, mismas que fueron corroboradas en la herramienta “Uniprot”; a) Secuencia de aminoácidos o peptídica, b) Secuencia de ADN o nucleotídica.

3.1.4.2 β - galactosidasa

De los 120 resultados descriptos por la base de datos “BRENDA” (Anexo 10; 57 organismos), la tabla 12 puntualiza los 14 mejores. β – gal es una enzima intracelular que ejecuta dos actividades catalíticas (Anexo 11) (Huber et al., 1976; Juers et al., 2012). La actividad hidrolítica de EC 3.2.1.23 se reportó en función de la lactosa como sustrato principal.

Tabla 11. Enzima EC 3.2.1.23 (β -galactosidasa)

Organismo	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	Observación	Referencia
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	0,10 - 0,12	212,00	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa ATCC 27009 • 65 - 70 °C y pH 6,0 	(Di Lauro et al., 2008; Kobayashi et al., 1978)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0,11 - 2,96	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa AT-7 • 65 °C y pH 6,0 - 6,4 	(Goodman & Pederson, 1976; Placier et al., 2009)
<i>Bispora sp.</i>	0,31	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa MEY-1 • 60 °C y pH 1,5 	(H. Wang et al., 2009)
<i>Hamamotoa singularis</i>	0,58	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa KCTC 7534 • 45 - 50 °C y pH 5 	(Cho et al., 2003)
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	0,70 - 0,75	63,00 - 63,10	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa V2-2 • 55 - 60 °C y pH 6,5 - 7,2 	(Nakao et al., 1994; A. R. Park & Oh, 2010)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,94 - 0,98	45,70 - 46,30	<ul style="list-style-type: none"> • Enzima mutante E491A (K_m) 	(Rhimi et al., 2009)

			= 0,94); 35 - 50 °C y pH 6,5 -7,0
			<ul style="list-style-type: none"> • Enzima salvaje (K_m = 0,98); 45 °C y pH 5,0 - 6,0
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	2,40	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa CBS8119 (Onishi & Tanaka, 1995) • 85 °C y pH 4,5 a 5,0
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	2,40	33,00	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa TAE 79 (Hoyoux et al., 2001) • 4 °C y pH 8,5
<i>Trichoderma reesei</i>	2,66	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa FTKO-39 ; Isoenzima BGT I (Adalberto et al., 2006) • 35 °C y pH 2,5
<i>Pisum sativum</i>	3,03	55,10	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa AP-3 (Dwevedi & Kayastha, 2009) • 60 °C y pH 4,0

Nota. Dato no disponible (-); K_m (Constante de Michaelis-Menten); K_{cat} (constante catalítica)

Fuente: (BRENDA, 2022e).

Para detectar la enzima de mayor actividad catalítica, se analizaron cuantitativamente los parámetros cinéticos K_m y K_{cat} . Los resultados de K_m fluctuaron en rango aproximado de 0,1 a 800 mM; no obstante, se consideró un intervalo situado entre 0,1 y 3,03 mM. Se evidenció valores considerablemente bajos, que sugieren

elevada afinidad por el sustrato (lactosa). De acuerdo con **Bauer et al., (2001)**, esto se debe a que a medida de que K_m disminuye, la unión del complejo ES aumenta. Además, menciona que esta representa la concentración del sustrato ($[S] = K_m$) en la que la velocidad de reacción equivale a la mitad de V_{max} ($v = \frac{v_{máx}}{2}$) (**Chatterjee et al., 1995; Medina, 2021**).

Según **Karr et al., (2012)**, K_{cat} determina el número de recambio ($K_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_T]}$), dado para predecir el comportamiento de un sistema. Al analizar los resultados, se visualizó valores implícitos entre 33,00 y 212,00 s^{-1} . Sobre este particular, se conoce que mientras mayor sea la constante, más rápida es la reacción de conversión del sustrato a producto. El parámetro se reportó únicamente en 5 de los 57 organismos identificados y tuvo como límite máximo 254,00 s^{-1} . Esto debido a la información exigua, provocada por la dificultad de las mediciones a nivel *in vitro* (**Davidi et al., 2016; F. Li et al., 2022**).

Producto del análisis, los organismos *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Bispora sp*, constituyeron los tres mejores resultados. No se evidencio diferencias significativas, sin embargo, se optó por la enzima termoestable de *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009, con valores correspondientes a 9,10 mM de K_m y 212,00 s^{-1} de K_{cat} . Cabe señalar que el efecto de la temperatura y pH sobre la determinación de la cinética de β -gal para ATCC 27009 fue evaluado por **Kobayashi et al., (1978)**, donde la actividad máxima se produce a pH 6,0 y una temperatura de 65 a 70 °C.

A. acidocaldarius es un organismo bacilar Gram positivo, de aproximadamente 0,5-1,0 μm de ancho y 2,0-4,5 μm de largo (**Goto et al., 2002; Mavromatis et al., 2010**), con una secuencia genómica de 3,16 Mb y 61,67 GC%. La Figura 22 ilustra la secuencia de aminoácidos (688 aa) y nucleótidos (2600 nt) que codifican para EC 3.2.1.23, extraídas bajo el código de acceso ABI84370.1 y DQ887754.1, de la base de datos "NHI". La proteína exterioriza un peso molecular y punto isoeléctrico teóricos equivalentes a 77,8 kDa y 5,42 (**Yuan et al., 2008**).

- a) MAKHAFIPNVQGFHLHGGDYNPDQWLAYPDVLEQDVQLMREAKWNVVSLGIFSWVSLEPEEGLFTFEWLDE
 AIERLTHAGVRILLATPSGARPAWLSAKYPEVLRVGPDRNRHGGRRHNHCYTSPIYREKVRINRKLAEYAH
 HPGVIGWHVSNEYGGEGCHPLCQEAFFREWLKRYKTLDALNHAWWTFWWSHTYTDWSQIESPMPHGETSIH
 GLNLDWKRFTVDQTVDFCRHEIEPLKQVNPPLPVTTFNFMGTYPGLNYWRFRDVLVDVISWDSYPRWHAHETL
 VPEAVHTAMVHDLNRSILKPKPFLLMESTPSVTNWQAVSKQKRPVHVHVLVSLQAVAHGADSVQYFQWRKSRGS
 YEKFHGAVVDHVGHANTRVFRDVQAVGEMLERLAPMAGAEVKADA AVIFD WENRWALED AKGPRNIGMHY
 EETVVNHYAALWRMGVPMDIVIDEEQLDGYKLVVAPMLYMRPVGVAERMKA FVERGGSLVLTYSWGVNDEN
 DLVFLGGFPPLRELAVWAEEDALYDGERVPRVADGNPLGLAGHYEARELCEVHLEGAEPYVYGADYY
 EGMPAATVHRVGKGVVYVAARLEDAFLRDFARVAEAGVARAIERELPDGVSAMVRSRGDGEVYVMLMNF
 TPEAREVALDEAEYKPLYGEAPTDGAVRLPAYGVSVLERPARNG
- b) CAGGTCGGCGCATATGAAACTCGGCGGTTTCAACAAGGCTGGCCTTTTACCGATGTGCTCGCGCAATGTT
 TCGGATCAAGCCTCTGTTTCGAAAAGACAGCCCCAGCGGGAGGATGAACGACGCCCCGGCGGACACGCTGA
 AAGACGTCTCCACTACATCGATGAGGCATCTCAGCGACAAGCTTCGCTGCCGACCTGGCGCGCGTCCGA
 CATGAGCGAAGGACATTTTGGCGTTTTCAAGGAGATGACCCACCGCAAGCCATGCAGTACGTGAACG
 AGCGGCGCGTGGCGCGGGCGGACAGCTGCTCAAGGACCCGAATCGAAGCATCACGGCCATCGGCATGG
 ACCTCGGTTTTACGACGTGAGCTATTTTCATCAAGGTGTTTCGACGCTACAAGCACTGCACACCGCTCGCG
 TACCGCAAGGCGCTGCTTAGGAAGCCACCGCGCAGTTGAGCGCGTCTAGAGAGGCTTGTGGCTTCCACA
 TGGACTCGAGTCCATTACGAATTAACACTGAAGGGAACGATGACCTATGGCCAAGCACGCACCCATTTTC
 CCGAACGTTCAAGGTTTTTGCACGGAGGCGATTACAACCCCGATCAGTGGCTGGCGTATCCGGATGTCCT
 CGAACAGGATGTCCAGCTGATGCGCGAAGCGAAGTGGAACGTCGTCTCTTGGGCATCTTCTCTGGGTG
 AGCCTGGAGCCCGAGGAGGGCTTGTTCACGTTTGAATGGCTCGACGAGGCCATCGAACGTCTGACGCATG
 CGGGCGTGGGATTCTGCTCGCCACGCCGAGCGGGCGCGCGGCCCGCTGGCTATCCGCCAAATACCCCGA
 AGTCTTCGCGTCCGACCCGACGGGCGGCGCAACCGGCACGGCGGCCGCAACAACACTGCTACACGTC
 GCCCATCTACCGCGAGAAGGTGCGGATCATCAACCGGAAGCTGGCGGAGCGGTACGCCCATCTCCGGGC
 GTGATCGGCTGGCAGTGTGCAACGAGTACGGCGCGAGTGCCACTGCCCCGTGTCAGGAGGCGTTTTTC
 GCGAGTGGCTGAAGCGAAAAGTACAAGACGCTTGACGCGCTCAACCACGCATGGTGGACGCGCTTTGGA
 GCCACACGTATACGGATTGGTTCGAGATCGAGTCCGCGCATGCCGCACGGCGAGACGTCGATTACGGGCTG
 AACCTCGACTGGAAGCGTTTCGTGACGGATCAGACGGTCGACTTCTGCCGCCATGAGATTGAGCCCCTCA
 AACAGGTGAATCCGAATCTTCCAGTACCACCAACTTCATGGGCACGTATCCAGGCCTCAACTACTGGCGC
 TTCGCGACGTGCTCGACGTCATCTCGTGGGACAGCTATCCGCGCTGGCAGCGCACGAGACGCTCGTCCC
 GGAGGCGGTGCACACCGCCATGGTGCACGATCTCAACCGTCCATCCTCAAGAAGCCATTTCTGCTCATGG
 AGTCCACGCCGAGCGTACCAACTGGCAGGCGGTGAGCAAACAGAAGCGCCCCGGCGTGCACGTGCTCG
 TCTCCCTCCAGGCCGTGCGCACGGCGCCGATTCCGGTGCAGTACTTCCAGTGGCGCAAAAGCCGCGGATC
 GTATGAAAAATTCCACGGCGCGTGGTGCATCAGTTCGGCCACGCCAACACCCGGGTGTTCCGCGACGTG
 CAAGCCGTGCGCGAGATGCTGGAGCGGCTTGCCCGATGGCCGGCGCGGAGGTGAAGGGCGGACGCGGCC
 GTCATCTTCGACTGGGAGAACCCTGGCGCTCGAGGACGCGAAGGGCCCGGAACATCGGCATGCAT
 ACGAGGAGACGGTCTGTAACCACTACGCGCGCTTTGGCGCATGGGCGTGGCGATGGACGTGATCGACGA
 GGAACAGCCGCTTACGGGTACAACTGGTCTGCGCGCGATGCTCTACATGGTGCACCCCGGCGTGGCC
 GAGCGGATGAAGCGTTTCGTGAGCGGGCGGGTTCGCTCGTCCCTACGTAAGTGGTCCGGCATCGTGGATG
 AGAACGATCTCGTCTTTTGGGCGGCTTCCCGGCCCGCTGCGCGAACTTGCGGGCGTGTGGGCTGAGGA
 GATCGACGCGCTGTACGACGGCGAGCGGGTGGCCGTTTCGAGTTGCCGACGGCAATCCGCTTGGCCTCGCG
 GGCCACTACGAGGCGCGCAACTGTGCGAGGTGGTTACCTCGAGGGCGCGGAACCCATCGCGGTGATCG
 GCGCGGACTACTACGAGGGCATGCCCGCGCAACGGTTACCCGCTGGGAAAGGGCAAGGTCTACTACGT
 GGCCGCGCGGCTCGAGGACGCGTTTTTGGCGGATTTCTTGGTCTGCGTGGCTGCGGAAGCCGGCGTGGCG
 CGCGCCATCGAGCGGGAGCTGCCGATGGCGTAAGCGCGATGGTGCCTCGGGAGATGGCGTGGAGTACG
 TCATGCTCATGAACTTACGCCCCGAGGCGCGGAGGTGGCGCTCGATGAAGCGGAGTACAAGCCACTCTAT
 GGAGAAGCGCCGACAGACGGCGCGGTTTCGGCTCCCCGCTACGGTGTGAGCGTGTGAGCGTGTGAGCGG
 CGAAATGGGTGAACGCGCGCTCTTTGGCCGTGAGATCCAGATCTCCAGTCTGACCTGGTCTGCAGG

Figura 22. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. Se ilustran las secuencias extraídas del recurso digital “GenBank” de la base de datos de nucleótidos “NHI”; a) Secuencia de aminoácidos o peptídica, b) Secuencia de ADN o nucleotídica.

3.1.4.3 Galactoquinasa

Los resultados extendidos en la base de datos “BRENDA” para EC 2.7.1.6, se analizaron respecto a los parámetro funcionales K_m y K_{cat} , en un rango de 0,091 a 5,87 mM y 0,38 a 146 s⁻¹, respectivamente. La actividad enzimática se muestra en la tabla

13, conforme a la galactosa como sustrato principal (reacción: $D - galactosa + ATP \rightleftharpoons \alpha - D - galactosa - 1 - P + ADP$). Los datos completos del escudriño se presentan a detalle en el anexo 12.

Tabla 12. *Enzima EC 2.7.1.6 (galactoquinasa)*

Organismo	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	Observación	Referencia
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0,09 - 0,10	0,38	<ul style="list-style-type: none"> Cepa EP; gen putativo <i>TcGALK-1</i> y <i>TcGALK-2</i> pH 8,6 	(Lobo-Rojas et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i>	0,10 - 13,00	0,40 - 8,70	<ul style="list-style-type: none"> Enzima mutante A198V ($K_m = 0,11$) Enzima mutante G347S ($K_m = 0,11$) 37 °C y pH 7,0 - 8,0 	(Blume & Beutler, 1971; Okano et al., 2001; Timson & Reece, 2003)
<i>Cricetulus griseus</i>	0,11	-	<ul style="list-style-type: none"> Hígado de hámster chino 37 °C y pH 7,4 	(Talbot & Thirion, 1982)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	0,40	0,91	<ul style="list-style-type: none"> Cepa MC2 50 °C y pH 7,5-7,8 	(Inagaki et al., 2006)
<i>Vacia faba</i>	0,50	-	<ul style="list-style-type: none"> Haba 25 °C y pH 7,3 	(Dey, 1983)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,53 - 0,60	22,30 - 55,80	<ul style="list-style-type: none"> • Enzima tipo salvaje (Schell & Wilson, 1977; Sellick & Reece, 2006) • 30 °C y pH 8,0
<i>Sus scrofa</i>	0,58	-	<ul style="list-style-type: none"> • Hígado de cerdo (Ballard, 1966) • 37 °C y pH 7,8
<i>Tetrahymena thermophila</i>	0,60	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa BIII (Lavine et al., 1982) • 41 °C y pH 7,8
<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i>	0,89	146,00	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa ATCC 15697 (L. Li et al., 2012) • 55 °C y pH 8 - 8,5
<i>Mycobacterium sp.</i>	1,00	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa 279 (Szumilo, 1982) • 37 °C y pH 7,8 - 7,8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,11 - 1,85	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa N3 (Tipo I/II de Dehnert) (L. Lee et al., 1977) • 45°C y pH 6,0

Nota. Dato no disponible (-); K_m (Constante de Michaelis-Menten); K_{cat} (constante catalítica)

Fuente: (BRENDA, 2022d)

Con respecto a la información reportada, se evidencio que la mejor actividad catalítica corresponde a la enzima putativa del protista *Trypanosoma cruzi* EP (código XP_813953.1). Ejemplar eucariota de la familia *Trypanosomatidae*, comúnmente relacionado al mal de Chagas (Flores et al., 2022; N Taxonomy Browser, 2022). Si bien la enzima presento mayor eficiencia catalítica ($3,8 \text{ mM s}^{-1}$) (Lobo-Rojas et al., 2016), su uso fue descartado conforme a lo expuesto anteriormente.

En este particular, se comparó la actividad catalítica de las enzimas nativas de organismos procariotas: *Pyrococcus horikoshii* y *Bifidobacterium longum subsp. Infantis*. No se evidencio diferencias significativas acorde a la afinidad de enzima por el sustrato; sin embargo, se optó seleccionar la de mayor constante catalítica. Con tal precepto, se seleccionó a la galactoquinasa codificada por ATCC 15697, misma que reporto valores correspondientes a 0,89 mM (K_m) y 146,00 s⁻¹ (K_{cat}).

Las bifidobacterias ATCC 15697 son bacterias anaeróbicas, Gram positivas de forma bífida con un tamaño de genoma de 2,83 Mb (Código CP001095.1)(**Assembly, 2022a; Chichlowski et al., 2020; O’Neill et al., 2017**). La figura 22 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de EC 2.7.1.6 codificada por el gen *Blon_2026*, obtenida a partir de la base de datos “UniProt” y corroborada por “NHI”, con código de acceso B7GUI0 y P001095.1:2213994-2215160, respectivamente. La secuencia peptídica contiene 416 aa, mientras la nucleótídica posee 1167 nt. El Peso teórico reflejado en la literatura corresponde a 22,23 kDa.

- a) MTAVEFIEPLTHEEGVSQATKLFVDTYGAAPEGVWAAPGRVNLIGEHTDYNAGLCLPIALPHRTFIAL
 KPREDTKVRVVSQVAPDKVAEADLDGLKARGVDGWSAYPTGVAWALRQAGFDKVKGFDAAFVSC
 VPLGSLSSAAMTCSTALALDDVYGLGYGDS DAGRVTLINAAIKSENEMAGASTGGLDQNASMR
 CTEGHALLLDCRPELPLENVSQQEFDLKYNLELLVDTQAPHQLNDGQYQRRATCEEAAKILG
 VANLRVTADGISKADDQFQALKETLDALPDETMMKRVRHVVTEIERVRSFVRAFAQGDIIKAAGRIF
 NASHDSLAAADYEVTVPELDIAVDVARKNGAYGARMTGGGFSGSIIALVDKGGQHEIAQKIADRFEK
 EGFNAPRALPAFAAASASREA
- b) TTA CTCTTAGCGCCCTCAGCGGGTTGATCGTCGGATGTTTGGTCTGCGGCGGACTGCTCGCCGG
 CGGACTGCTCGTTGGCCGGCGGTGCGGTCGGTCCGGCGGTTCCGGCGGTGCGGGCAGTTCCGG
 CGGGCCGGCAGTTCGGCGGGGCGCGGCTCGGCGGCGGATGACACGGACGTATCGGCAAC
 CGCGGCGGTCTCGCCGACTCGTCCTGAACGGGTGCAACGCCTGGGTGCTTTCCAGGGCGGCG
 GCCTGCTCGTCCAGCGGAATGCCCTGCCAGGTGAGCGTGTTCAGCGGCGCAACAGTCT
 CGCCATAGCGGCGGTGCGGCGGAATGACGGAATTGGCCAAACGGGCGATGCCTTCGGACGG
 CTCGTCACTGCCCTCGATGGCCTTGGTCGCCGCCAGCACATGATGGGCGGTGTCGGACTTG
 GCTTCGACTTCGGCATCCGGGAAGAACAGGGCGGAATCGTAGGAGCCATGAGCCTCGTCACGCA
 CGATCTTGCCGTTGTGACGTTTCGACCACGCGCTTGCATCGAGTTGACGATCTCTCGTTATGC
 GTGGCCATGACGATGGTGGTGGCGGTGCGGTTGATGGCGTCCAGCACTTCCATGATGCCAGCG
 AAGTGGTGGGTCGAGGTTGCCGGTGGGCTCGTCGGCCAGCAGAATCTGCGGGTGATTCACGTA
 GGCGCGGGCGATGGCCACACGCTGCTGCTGCCACCGGAGAGCTCATGTGGGTAGTTCTTTCC
 TTGCCGGTAAGCCCCACGGTATCCAGCACCTTGGGCACCAACGATTTGATGGTGGACCCGCG
 TGCCGATCACCTCAAGGGCGAACGCCACGTTCTCCATACGGTTTTGTTATTGAGCAGCTTGTA
 TCCTGGAACACGAAGCCCAGCGAACGGCGGTACTGCGGCACTTGACGGTGGTGGTGGCGCCG
 AGATCGTTGCCGGCCACGCGAATCTCGCGTGGTGGCCTTCTCTCGCGCAACAGCAGGCTCA
 AGAGCGTGGTCTTGCCGGAGCCGGACGCACCCACAAGGAACACGAAATCACCGCGTTCGATATC
 GAGGTTGATGTCGTC AAGCGCGGTGCGGTGCCCTTTGGGATAGATCTTGACACATTGTCCAGTG
 AGATCAGTGCCAT

Figura 23. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima galactoquinasa (EC 2.7.1.6) de *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* ATCC 15697; Se ilustran las secuencias extraídas del recurso digital “GenBank” de la base de datos de nucleótidos “NHI”; a) Secuencia de aminoácidos o peptídica, b) Secuencia de ADN o nucleótídica.

3.1.4.4 Galactosa-1-P-uridiltransferasa

Con objeto de valorar la especificidad de la galactosa – 1 – P – uridiltransferasa respecto a la galactosa – 1 – P, se llevó acabo el estudio de los parámetros cinéticos aparentes: K_m y K_{cat} . Los valores de K_m se recopilaron en un intervalo comprendido entre 0,01 y 4. Mientras el K_{cat} se registró en un rango implícito entre 0,05 a 987 s^{-1} . Los datos suministrados para la enzima EC 2.7.7.10/ EC 2.7.7.12 se resumen a detalle en la tabla 14 y Anexo 13.

Tabla 13. *Enzima EC 2.7.7.10; EC 2.7.7.12 (galactosa-1-P-uridiltransferasa)*

Organismo	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	Observación	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	0,01 - 1,18	3,50 - 98	<ul style="list-style-type: none"> • Glóbulos rojos y tejido placentario • 37 - 42 °C y pH 8,0 - 8,8 	(Davit-Spraul et al., 1994; McCorvie et al., 2013; Wells, 1997; Williams et al., 1982)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	0,08	-	<ul style="list-style-type: none"> • Arquea hipertermófila • 50 °C y pH 7,5 	(Ohshida et al., 2020)
<i>Gracilaria changii</i>	0,12	-	<ul style="list-style-type: none"> • Alga roja agarofítica • 25 °C y pH 7,5 	(Siow et al., 2012)
<i>Escherichia coli</i>	0,13 - 1,54	0,05 - 780,00	<ul style="list-style-type: none"> • Mutante recombinant e C160A (XL1-Blue) • 27 °C y pH 7,0 - 8,5 	(Sandaruwan Geeganage & Frey, 2002; Sandurawan Geeganage & Frey, 1999)

<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,30 - 6,66	-	<ul style="list-style-type: none"> • 37 °C y pH 7,5 - 8,7 	(L. J. Lee et al., 1978)
<i>Galdieria sulphuraria</i>	0,40	-	<ul style="list-style-type: none"> • Alga roja • 19 - 35 °C y pH 7,0 - 9,0 	(Gross & Schnarrenberger, 1995)
<i>Entamoeba histolyca</i>	0,42	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa K-9 • 30 °C y pH 7,0 	(Lobelle & Reeves, 1983)
<i>Cucumis sativus</i>	1,20	-	<ul style="list-style-type: none"> • Pepino • 30 °C y pH 6 - 7,5 	(Smart & Pharr, 1981)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,00	987,00	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa 106-3D • 25 °C y pH 8,4 - 8,8 	(Fukasawa et al., 1982; Fukasawa & Segawa, 1979)

Nota. . Dato no disponible (-); K_m (Constante de Michaelis-Menten); K_{cat} (constante catalítica)

Fuente: (BRENDA, 2022b, 2022f)

Se escogió los cinco mejores resultados, tomando como referencia los parámetros cinéticos K_m y K_{cat} . Para ellos se consideraron las enzimas procedentes de: *Homo sapiens*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Gracilaria changii*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidum*. En general, los valores reportados para cada proteína no mostraron variaciones significativas referentes a la afinidad por el sustrato. De tal manera que, los valores de K_{cat} facilitaron la elección.

A pesar de que la enzima de *Homo sapiens* presentó mayor actividad enzimática (código AAC83409.1), su implementación fue descartada. Es así que en función a lo anteriormente mencionado, se escogió la enzima galactosa-1-P-uridiltransferasa codificada por el gen galT de la cepa mutante XL1-Blue de *Escherichia coli* (C160→A ;código CP081007.1) (Assembly, 2022b). Las secuencias identificadas mediante “NHI” tienen código de acceso QZA45581.1 y CP081007.1:8592-9638. Como se muestra en la figura 24, estas se encuentran

constituidas por 348 aa y 1047 nt, correspondientemente. El Peso teórico señalado corresponde a 22,23 kDa.

- a) MTQFNVPVDHPHRRYNPLTGQWILVSPHRAKRPWQGAQETPAKQVLPADHPDCFLCAGNVRVTGDK
 NPDYTGTYVFTNDFALMSDTPDAPESHDPMLMRCQSARGTSRVICFSPDHSTLPELSVAALTEIVK
 TWQEQTAEELGKTYPWVQVFENKGAAMGCSNPHPHGQIWANSFLPNEAEREDRLQKEYFAEQKSP
 MLVDYVQRELADGSRVTVETEHWLAVVPYWAAWPFETLLLPAHVLRITDLTDAQRSDLALALKK
 LTSRYDNLQCSFPYSMGWHGAPFNGENQHWQLHAHFYPLLRSATVRKFMVGYEMLAETQRD
 LTAEQAAERLRAVSDIHFRESGV
- b) TTACTCCGGATTTCGCGAAAATGGATATCGCTGACTGCGCGCAAACGCTCTGCTGCCTGTTCTG
 CGGTACAGTCTCGCTGGGTCTCTGCCAGCATTTCATAACCAACCATAAATTTACGTACGGTGGCG
 GAGCGCAGCAGAGGCGGATAAAAAGTGCAGCGTGCAGCTGCCAGTGTGATTCTCTTCGCCATTAA
 ATGGCGCGCCGTGCCAGCCATAGAGTAGGGGAAGGAGCACTGGAAGAGGTTGTCATAACGAC
 TGGTCAGCTTTTTCAACGCCAGCGCCAGATCGCTGCGCTGGGCGTCCGTTCAAATCGGTGATCCG
 TAAAACGTGGGCTTTGGGCAGCAGTAGCGTTTTCGAACGGCCAGGCAGCCAGTAAGGCACGAC
 GGCTAACAGTGTTCGGTTTCGACAACGGTACGGTACCGTCTGCCAGCTCGCGCTGAACATAA
 TCCACCAGCATTGGTGATTCTGTTTCGGCAAATATTCTTTTTGCAGGCGGTCTTCGCGCTCAGC
 TTCGTTAGGCAGGAAGCTATTTGCCCAAATCTGACCGTGCAGGATGCGGGTTAGAGCAGCCCATC
 GCCGCGCCTTTGTTTTCAAAAACCTGCACCCATGGGTACGTTTTCCCAAGTTCTGCGGTTTGCTC
 CTGCCAGGTTTTGACGATTTCCGTCAATGCTGCAACGCTGAGCTTGGCAGCGTTTTACTGTGAT
 CCGGTGAAAAGCAGATCACCCGGCTGGTGCCGCGCGCTCTGGCAACGCATCAGCGGATCGT
 GACTTTCTGGCGCATCTGGCGTGTGACACATCAAAGCCGCAAAGTCATTAGTAAAAACGTAAGT
 CCCGGTGTAATCGGGTTTTATCGCCTGTACCCGCACATTACCTGCGCAGAGGAAGCAATCTG
 GATCGTGCAGGTAACACCTGTTTGGCTGGCGTTTCCTGCGCCCCCTGCCAGGGGCGCTTAGC
 GCGGTGCGGTGAAACCAGAATCCATTGCCCGGTGAGCGGGTTGTAGCGGCGATGTGGATGATCA
 ACGGGATTAATTGCGTCAT

Figura 24. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enzima galactosa-1-P-uridiltransferasa (EC 2.7.7.10/EC 2.7.7.12) de la cepa mutante *Escherichia coli* XL1-Blue. Se ilustran las secuencias extraídas del recurso digital “GenBank” de la base de datos de nucleótidos “NHI”; a) Secuencia de aminoácidos o peptídica, b) Secuencia de ADN o nucleotídica

3.1.5 Diseño y construcción de ruta metabólica para producción de celulosa a partir de lactosa

Se utilizó cerca de cinco genes y/o genomas, que codifican a un receptor y cuatro donantes. Las cepas bacterianas implementadas fueron: i) *Komagataeibacter xylinus* E25 (receptor); y los donantes: ii) *Escherichia coli* K-12 (*lacY*); iii) *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATC 27009 (ABI84370.1); iv) *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* ATCC 15697 (*Blon_2026*) y v) *Escherichia coli* XL1-Blue (*galT*). Elección que tiene como respaldo los resultados instituidos en el punto 3.1.4, respecto al ensayo de actividad catalítica (Anexo 14).

La figura 25 presenta el esquema metabólico afín al consumo de lactosa y producción de celulosa en *Komagataeibacter xylinus* E25. En este se representa el

metabolismo central de síntesis de celulosa, en conjunto a las reacciones de equipamiento. Modelo que acopla dos módulos principales, relacionados con: i) el transporte e hidrolisis de Lactosa, y ii) el metabolismo de biosíntesis de celulosa. El primero establecido conforme a la ruta de Leloir; metabolismo que se tomó como guía para el diseño. Este fragmento de la red, contiene toda la maquinaria catalítica para llevar a cabo la biogénesis de CB a partir de un disacárido (Alusivo a los literales 1 – 4 de la red), en cotejo con el segundo módulo que mantiene el metabolismo central y por ende únicamente maquinaria catalítica nativa de E25 (Literales 5 – 8). Cabe mencionar que se mantuvo como premisa que el equipamiento del metabolismo de *K. xylinus* bajo la expresión heteróloga conseguiría, en principio, promover la producción de CB mediante lactosa como única fuente de carbono, resultado análogo al estudio de **Battad et al., (2004)**.

Como descripción general (Anexo 15), el inicio de ruta comprende la captación y traslación la de lactosa por el simportador Lactosa/H⁺ codificado por el gen *lacY*. Intracelular, la lactosa es hidrolizada en sus monómeros estructurales, glucosa y galactosa, por la enzima β – galactosidasa del gen *ABI84370.1*. La glucosa se metaboliza normalmente. Mientras que, posterior a la escisión, la fosforilación de la galactosa es mediada por acción del gen *Blon_2026* que traduce la galactoquinasa, enzima encargada de la obtención de la galactosa – 1 – P. Finalmente para dar paso a isomerización de la galactosa – 1 – P, *galT* proporciona la galactosa – 1 – P uridiltransferasa, enzima encargada de la producción de glucosa – 1 – P. Una vez conseguido esto, se da paso a la obtención del intermediario glucolítico glucosa – 6 – P, considerado como el origen de la síntesis de CB, tal como menciona **Liu et al., (2018)**. Posterior a esto, el proceso se asemeja a los modelos dilucidados en los estudios de **Ross et al., (1991)**, **Cheng Zhong et al., (2013)** y **Lustri et al., (2015)**.

Se han obtenido resultados semejantes en investigaciones independientes. **Battad et al., (2004)**, insertaron un plásmido pLBT::*lacZ:kan* para la producción de CB en *lacto suero* por parte de *K. xylinus* ITDI 2.1, mientras **Garro et al., (2018)**, implementaron la biosintética para el rediseño metabólico y optimización de rutas. Esto acorde al aprovechamiento de residuos como fuente de carbono.

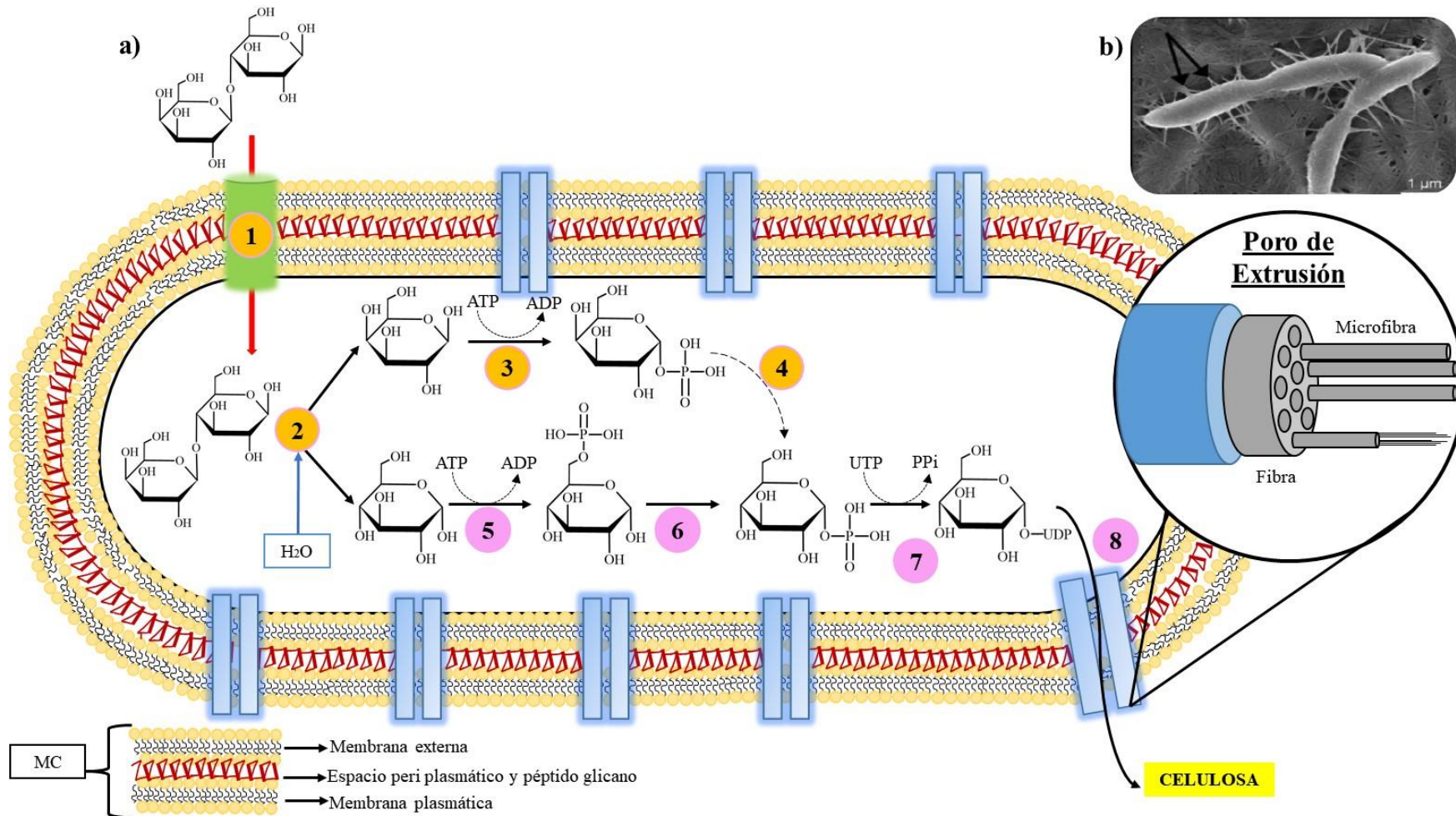


Figura 25. Ruta biosintética de producción de celulosa a partir de lactosa como sustrato principal en *K. xylinus* E25. **a)** Ruta biosintética; Simportador y enzimas insertadas (1 – 4; tonalidad naranja); Enzimas nativas (5 – 7; tonalidad rosa); [Proteínas recombinantes: 1, (PERM); 2, (β - galactosidasa); 3,

(galactoquinasa); **4**, Galactosa – 1 – P uridiltransferasa. **Maquinaria catalítica nativa: 5**, (glucoquinasa); **6**, (fosfoglucomutasa); **7**, (UTP– glucosa – 1 – fosfato uridiltransferasa) y **8**, (Complejo catalítico celulosa sintasa)]. **b**) Micrografía de *K.xylinus* E25 a 1µm. Las figuras alternas indican la formación de las fibras de CB y los poros de extrusión.

3.2 Verificación de la hipótesis

Se analizó de forma *in silico* las rutas metabólicas requeridas para la biogénesis de celulosa bacteriana en *Komagataeibacter xylinus* a partir de lactosa, con lo cual se plantearon las siguientes hipótesis:

3.2.1 Hipótesis nula (H₀)

Las modificaciones de la ruta metabólica de la biogénesis, tras la inserción del requerimiento mínimo de genes, no otorgan a *Komagataeibacter xylinus* la capacidad de biosintetizar celulosa bacteriana a partir de lactosa.

3.2.2 Hipótesis alternativa (H₁)

Las modificaciones de la ruta metabólica de la biogénesis, tras la inserción del requerimiento mínimo de genes, otorgan a *Komagataeibacter xylinus* la capacidad de biosintetizar celulosa bacteriana a partir de lactosa.

Por tanto, se aceptó la hipótesis alternativa, “Las modificaciones de la ruta metabólica de la biogénesis, tras la inserción del requerimiento mínimo de genes, otorgan a *Komagataeibacter xylinus* la capacidad de biosintetizar celulosa bacteriana a partir de lactosa”, y se rechaza la hipótesis nula. Esto debido a que la ruta biosintética manifiesta una posible alternativa al metabolismo de la lactosa, y además es corroborado por estudios independientes, donde se ha insertado un único gen.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El análisis filogenético demostró la eminente contigüidad entre OTUs, estimada a partir de la homología de secuencia y el porcentaje de divergencia intraespecífico (1%), esto debido al bajo grado de diferenciación entre cepas. Es así que se obtuvo como resultado una notable proximidad entre DSM 2004 y las cepas TJU-D2, E25, ZUSTBC001, XJL0-06-4, G7-3, CAV69, LGM 1523, DSM 46603, LGM 25 y OTG001, donde mediante un análisis complementario se identificó a E25 como cepa análoga a DSM2004 a pesar de las diferencia poco significativas con TJU-D2.

Por medio de un análisis *in silico* de rutas metabólicas, se evidencio la ausencia total de las actividades catalíticas vinculadas al catabolismo de lactosa en *K. xylinus*. Es así que a través del análisis de Leloir y Tagatosa 6-P de BAL, se evidencio el requerimiento mínimo de genes, para otorgarle a *K. xylinus* la capacidad de sintetizar celulosa mediante lactosa como fuente de carbono. Lo que en este particular, permitió plantear el desarrollo de una ruta biosintética.

Se identificaron transportadores y enzimas involucrados en la traslación y catabolismo lactosa en BAL, por medio de un análisis de redes metabólicas se evidenció la presencia de un sistema de intercambio y cuatro actividades catalíticas fundamentales. Producto de la información evaluada, se seleccionó a la ruta de Leloir como base para el diseño del módulo de captación y conversión de lactosa en *K. xylinus* E25.

Mediante un testeo bioinformático, se evaluó la presencia de genes que codifican para transportadores y enzimas, encargados tanto de absorción como conversión de lactosa a Glucosa 6-P en *Komagataeibacter xylinus* E25, lo cual permitió evidenciar su ausencia total y corroborar así la inhabilidad de este ejemplar para producir CB respecto a la sustitución total de la fuente de carbono por lactosa.

A partir de la selección de las enzimas de mayor actividad catalítica, se determinaron las secuencias de los genes a introducir en *Komagataeibacter xylinus* para otorgarle la capacidad de biosintetizar celulosa bacteriana a partir de la lactosa como sustrato principal, los genes seleccionados fueron *lacY* (*Escherichia coli* K-12), *ABI84370.1* (*Alicyclobacillus acidocaldarius* ATC 27009), *Blon_2026* (*Bifidobacterium longum subsp. Infantis* ATCC 15697) y *galT* (*Escherichia coli* XL1-Blue). Estos se identificaron de acuerdo a su procedencia mediante los recursos digitales de “Uniprot” y “NHI”.

El metabolismo reconfigurado acopla el catabolismo de lactosa y la biosíntesis de CB, estableciendo una red metabólica relativamente funcional que representa una alternativa óptima para la implementación de residuos y/o sustancias de desecho, como materia prima para la obtención de metabolitos de elevado valor agregado.

4.2 Recomendaciones

Llevar a cabo procesos de mutagénesis mediante la implementación de diversas cepas *Komagataeibacter xylinus*. Paralelamente, realizar un análisis de expresión a partir del ARN, como una alternativa de verificación de la funcionalidad de la maquinaria catalítica insertada.

Precisar el uso de programas bioinformáticos (Escher – FBA; BIGG Models; METATOOL) coligados al modelamiento de redes metabólicas, a fin de comprobar la funcionalidad de la ruta biosintética mediante un análisis de balance de flujo.

Tomar en consideración, detalles asociados a la remoción de intrones, la optimización de codones y el desarrollo de modificaciones postraduccionales, dado que esto permitiría la implementación de enzimas con parámetros funcionales mejor establecidos, acorde a la afinidad con el sustrato y eficiencia.

Acrecentar el campo de estudio en torno al aprovechamiento de fuentes de carbono alternativas, incluyendo residuos y/o subproductos agroindustriales (Salvado de arroz, licor macerado de maíz, jugo de sisal, liquido de tapioca, etc.), con objeto de desarrollar medios enriquecidos de bajo costo, afines a la producción de CB.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J., & Wright, E. M. (2021). Function Trumps Form in Two Sugar Symporters, LacY and vSGLT †. *Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073572>
- Adalberto, P. R., Massabni, A. C., Goulart, A. J., Contiero, J., Carmona, E. C., Cardello, L., & Monti, R. (2006). Production of β -galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran: Partial purification of two isozymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133(2), 163–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:133:2:163>
- Amaro, T. M. M. M., Rosa, D., Comi, G., & Iacumin, L. (2019). Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992>
- Antonovsky, N., Gleizer, S., Noor, E., Zohar, Y., Herz, E., Barenholz, U., Zelcbuch, L., Amram, S., Wides, A., Tepper, N., Davidi, D., Bar-On, Y., Bareia, T., Wernick, D. G., Shani, I., Malitsky, S., Jona, G., Bar-Even, A., & Milo, R. (2016). Sugar Synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*. *Cell*, 166(1), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.064>
- Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Ferrer, J., Ramones, E., Mazzarri, C., & Rincón, M. (2007). Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de b-D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería/ Universidad Del Zulia*, 30. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702007000100008
- Arbiza, L., Patricio, M., Dopazo, H., & Posada, D. (2011). Genome-wide heterogeneity of nucleotide substitution model fit. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 896–908. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr080>
- Assembly, N. (2022a). *ASM2042v1 - Genome - Assembly - NCBI*.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000020425.1#/def

Assembly, N. (2022b). *Escherichia coli genome assembly ASM1964599v1 - NCBI - NLM*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_019645995.1/

Atta, O. M., Manan, S., Ahmed, A. A. Q., Awad, M. F., Ul-Islam, M., Subhan, F., Ullah, M. W., & Yang, G. (2021). Development and characterization of yeast-incorporated antimicrobial cellulose biofilms for edible food packaging application. *Polymers*, *13*(14). <https://doi.org/10.3390/polym13142310>

Axelsson, L., Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: Classification and Physiology in Microbiological and Functional Aspects* (Third Edition, Vol. 139). CRC Press. https://books.google.com.ec/books?id=P0p5_uXL9uQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Aydin, Y. A., & Aksoy, N. D. (2009). Isolation of Cellulose Producing Bacteria from Wastes of Vinegar Fermentation. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, *2178*(1), 99–102. http://www.iaeng.org/publication/WCECS2009/WCECS2009_pp99-102.pdf

Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Department of Chemical and Biological Engineering*, *27*, 2141–2149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>

Baghaei, B., & Skrifvars, M. (2020). All-Cellulose Composites: A Review of Recent Studies on Structure, Properties and Applications. *Molecules*, *25*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122836>

Bajaña, W., & Mocayo, C. (2012). La visita medica como alternativa en la promoción de los productos farmaceuticos. *UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL*, *Guayaquil-Ecuador*, 137. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/419/3/T-UCSG-POS-MGSS-4.pdf>

- Ballard, F. J. (1966). Purification and properties of galactokinase from pig liver. *Biochemical Journal*, 98(1), 347–352. <https://doi.org/10.1042/BJ0980347>
- Balseca, E. (2021). Análisis filogenético de *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 para la producción de biofilms a partir de suero lácteo. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO*, 7(Ambato-Ecuador), 48. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32072/1/AL_764.pdf
- Barrero, L. (2009). Microbiología clínica. *Universidad Europea de Madrid*, 1, 36–65. <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Bashiri, G., & Baker, E. N. (2014). *REVIEW Production of recombinant proteins in Mycobacterium smegmatis for structural and functional studies*. <https://doi.org/10.1002/pro.2584>
- 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, 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00007-2)
- Bauer, C., Osman, A. M., Cercignani, G., Gialluca, N., & Paolini, M. (2001). A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of k_{cat} , K_M , and k_{cat}/K_M and the relevant ΔG_0^\ddagger values—possible implications in chemotherapy and biotechnology. *Biochemical Pharmacology*, 61(9), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00579-2)
- Bazzone, A., Tesmer, L., Kurt, D., Kaback, H. R., Fendler, K., & Madej, M. G. (2022). Investigation of sugar binding kinetics of the *E. coli* sugar/H⁺ symporter Xyle using solid-supported membrane-based electrophysiology. *Journal of Biological Chemistry*, 298(2), 101505. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101505>
- Blume, K. G., & Beutler, E. (1971). Purification and properties of galactokinase from human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 246(21), 6507–6510. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)34143-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)34143-2)

- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- BRENDA. (2022a). *BRENDA - Information on EC 2.4.1.12 - cellulose synthase (UDP-forming)*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.12#SINÓNIMO>
- BRENDA. (2022b). *BRENDA - Information on EC 2.7.7.10 - UTP-hexose-1-phosphate uridylyltransferase - BRENDA Enzyme Database*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.7.10#KM> VALUE [mM]
- BRENDA. (2022c). *BRENDA -Information on EC 3.2.1.23 - beta-galactosidase and Organism(s) Alicyclobacillus acidocaldarius and UniProt Accession Q0R5R5*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.23&UniProtAcc=Q0R5R5&OrganismID=243>
- BRENDA. (2022d, January 14). *BRENDA - Information on EC 2.7.1.6 - galactokinase*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.1.6#KM> VALUE [mM]
- BRENDA. (2022e, January 14). *BRENDA - Information on EC 3.2.1.23 - beta-galactosidase*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.23#TURNOVER> NUMBER [1/s]
- BRENDA. (2022f, March 23). *BRENDA - Information on EC 2.7.7.12 - UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase - BRENDA Enzyme Database*. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.7.12#TURNOVER> NUMBER [1/s]
- Brown, A. J. (1886). XLIIL-On an Acetic Ferment which form Cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49(432), 432–439.

- Brown, R. M., & Saxena, I. M. (2000). Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)
- Brown, R. M., Willisont, J. H. M., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Cell Biology*, 73(12), 4565–4569.
- Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose*, 23(1), 57–91. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>
- 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
- Cerda, L. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal, Celulasas de interés biotecnológico papelerero. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.031>
- Chatterjee, S., Suci, D., Dalbey, R. E., Kahn, P. C., & Inouye, M. (1995). Determination of K_m and k_{cat} for signal peptidase I using a full length secretory precursor, pro-OmpA-nuclease A. *Journal of Molecular Biology*, 245(4), 311–314. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0025>
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chichlowski, M., Shah, N., Wampler, J. L., Wu, S. S., & Vanderhoof, J. A. (2020). *Bifidobacterium longum* Subspecies *infantis* (*B. infantis*) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/nu12061581>

- Cho, Y. J., Shin, H. J., & Bucke, C. (2003). Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters*, 25(24), 2107–2111. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000007077.58019.bb>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the. *American Society for Microbiology*, 33(4), 1–74.
- Compton, J. (1948). The Molecular Constitution of Cellulose. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 3(C), 185–228. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60030-2](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60030-2)
- Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. Front Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers in Microbiology*, 2027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1021/bm060620d>
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- Davidi, D., Noor, E., Liebermeister, W., Bar-Even, A., Flamholz, A., Tumbler, K., Barenholz, U., Goldenfeld, M., Shlomi, T., & Milo, R. (2016). Global characterization of in vivo enzyme catalytic rates and their correspondence to in vitro k_{cat} measurements. *SYSTEMS BIOLOGY*, 113(12), 3401–3406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514240113>
- Davit-Spraul, A., Pourciayb, M. L., Heng Ng, K., Soni, T., & Lemonnierayb, A. (1994). *Regulatory effects of galactose on galactose-1-phosphate*

uridylyltransferase activity on human hepatoblastoma HepG2 cells.

- Dey, P. M. (1983). Galactokinase of *Vicia faba* seeds. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 136).
- Di Lauro, B., Strazzulli, A., Perugino, G., La Cara, F., Bedini, E., Corsaro, M. M., Rossi, M., & Moracci, M. (2008). Isolation and characterization of a new family 42 β -galactosidase from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*: Identification of the active site residues. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784(2), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.013>
- Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2009). A β -galactosidase from pea seeds (PsBGAL): purification, stabilization, catalytic energetics, conformational heterogeneity, and its significance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7086–7096. <https://doi.org/10.1021/jf900874p>
- Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>
- Eslahi, N., Mahmoodi, A., Mahmoudi, N., Zandi, N., & Simchi, A. (2020). Processing and Properties of Nanofibrous Bacterial Cellulose-Containing Polymer Composites: A Review of Recent Advances for Biomedical Applications. *Polymer Reviews*, 60(1), 144–170. <https://doi.org/10.1080/15583724.2019.1663210>
- Feist, A. M., Herrgård, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., & Palsson, B. Ø. (2011). Reconstruction of Biochemical Networks in Microbial Organisms. *Nat Rev Microbiol*, 7(2), 129–143. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1949>
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution/ Department of Genetics, University of Washington*, 17(3), 368–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01734359>

- Finny, A. S., Popoola, O., & Andreescu, S. (2021). 3d-printable nanocellulose-based functional materials: Fundamentals and applications. *Nanomaterials*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/nano11092358>
- Flores, V. I., Zumaquero, L., & Perez, M. (2022). Pharmaceutical agents for the treatment of Chagas disease: patenting trends in 2016-2021 period. *Pharmaceutical Patent Analyst*. <https://doi.org/10.4155/PPA-2022-0005>
- Fontana, J. D., De Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., De Souza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A., & Farah, L. F. X. (1990). Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *24–25*(1), 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF02920250>
- Fu, L., Zhang, J., & Yang, G. (2013). Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>
- Fukasawa, T., & Segawa, T. (1979). The enzymes of the galactose cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of galactose-1-phosphate uridylyltransferase - PubMed. *J Biol Chem*, *254*(21), 10707–10709. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/387754/>
- Fukasawa, T., Segawa, T., & Nogi, Y. (1982). [99] Uridine diphosphate glucose-4-epimerase and galactose-1-phosphate uridylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 89, Issue C, pp. 584–592). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)89101-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)89101-5)
- Gallegos, A. M. A., Carrera, S. H., Parra, R., Keshavarz, T., & Iqbal, H. M. N. (2016). Bacterial Cellulose: A Sustainable Source to Develop Value-Added Products – A Review. *BioResources*, *11*(2), 5641–5655. <https://doi.org/10.15376/BIORES.11.2.5641-5655>
- Gama, M., Gatenholm, P., & Klemm, D. (2013). *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material* - Google Libros (Taylor & Francis Group

(ed.)). CRC Press.
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=kavQ4G0jjfcC&oi=fnd&pg=PP1&ots=M-nWd_4xVE&sig=dHfyQH-JZw-JOx1mDv1nmz4KCVg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

García, R. (2015). Modelos de sustitución de nucleótidos. *Facultad de Ciencias, UNAM, September*, 13. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2048.8168>

Garro, G., García, D., Valerín, K., & Jiménez, K. (2018). Optimización de una ruta metabólica en *Escherichia coli* para la producción de farneseno mediante el uso de biología sintética. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3957>

Gayathry, G., & Gopalaswamy, G. (2014). Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 39(1), 93–96.

Geeganage, Sandaruwan, & Frey, P. A. (2002). Galactose-1-phosphate uridylyltransferase: Kinetics of formation and reaction of uridylyl-enzyme intermediate in wild-type and specifically mutated uridylyltransferases. *Methods in Enzymology*, 354(1990), 134–148. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)54010-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)54010-6)

Geeganage, Sandurawan, & Frey, P. A. (1999). Significance of Metal Ions in Galactose-1-Phosphate Uridylyltransferase: An Essential Structural Zinc and a Nonessential Structural Iron[†]. *Biochemistry*, 38(40), 13398–13406. <https://doi.org/10.1021/BI9910631>

Gelin, K., Bodin, A., Gatenholm, P., Mihranyan, A., Edwards, K., & Strømme, M. (2007). Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. *Polymer*, 48(26), 7623–7631. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.10.039>

Ghajarieh, A., Habibi, S., & Talebian, A. (2021). *Biomedical Applications of Nanofibers*. 94(7), 847–872. <https://doi.org/10.1134/S1070427221070016>

- Ghozali, M., Meliana, Y., & Chalid, M. (2021). Synthesis and characterization of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using liquid tapioca waste. *Materials Today: Proceedings*, *44*, 2131–2134. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.274>
- Girneata, A. (2015). The Evolution Of The Textile And Clothing Industry - Romania: From Lohn To Loss. *The Bucharest University of Economic Studies*, *67*(4), 176–187. <http://economice.ulbsibiu.ro/revista.economica/archive/67412girneata.pdf>
- Glaser, L. (1958). The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*. *The Journal of Biological Chemistry*, *232*(2), 627–636. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77383-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77383-9)
- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, *27*(3), 17–24. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>
- Goodman, R. E., & Pederson, D. M. (1976). β -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, *22*(6), 817–825. <https://doi.org/10.1139/m76-118>
- Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Mochida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H., & Inagaki, K. (2002). Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, *6*(4), 333–340. <https://doi.org/10.1007/S00792-001-0262-3>
- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Purification and characterization of a galactose-1-phosphate: UDP-glucose uridylyltransferase from the red alga *Galdieria sulphuraria*. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 234).
- 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>

Halib, N., Amin, M. C. I. M., & Ahmad, I. (2012). Physicochemical Properties and Characterization of Nata de Coco from Local Food Industries as a Source of Cellulose. *Sains Malaysiana*, *41*(2), 205–211.

Hernández, L. (2018). “DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA.” *UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR*, *10*(1), 108. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/Hernandez-Lisbeth.pdf>

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>

Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., François, J. M., Baise, E., Feller, G., & Gerday, C. (2001). Cold-Adapted β -Galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(4), 1529–1535. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1529-1535.2001>

Hu, W., Chen, S., Yang, J., Li, Z., & Wang, H. (2014). Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *101*(1), 1043–1060. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.102>

Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., & Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, *21*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>

Huber, R. E., Kurz, G., & Wallenfels, K. (1976). A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, *15*(9), 1994–2001. <https://doi.org/10.1021/BI00654A029>

- 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)
- Ibal, J. C., Pham, H. Q., Park, C. E., & Shin, J. H. (2019). Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. *PLOS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212090>
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004775229149>
- Inagaki, E., Sakamoto, K., Obayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Bessho, Y., Kuroishi, C., Kuramitsu, S., Shinkai, A., & Yokoyama, S. (2006). Structural Biology and Crystallization Communications Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of galactokinase from *Pyrococcus horikoshii*. *Crystallization Communications Acta Cryst*, 62, 169–171. <https://doi.org/10.1107/S1744309106001813>
- Jacek, P., Dourado, F., Gama, M., & Bielecki, S. (2019). Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 633–649. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13386>
- Jaramillo, R., Tobio, W., & Escamilla, J. (2012). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. *Revista MVZ Cordoba*, 17(2), 3004–3013. <https://doi.org/10.21897/rmvz.235>
- Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., & Schomburg, D. (2019). BRENDA in 2019: A European ELIXIR core data resource. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D542–D549. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1048>
- 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)

- 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>
- Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci*, *21*(12), 1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Kaback, H. R. (2015). A chemiosmotic mechanism of symport. *Perspective*, *112*(5), 1259–1264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419325112>
- Kaback, H. R., & Guan, L. (2019). It takes two to tango: The dance of the permease. *Journal of General Physiology*, *151*(7), 878–886. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912377>
- Kadier, A., Ilyas, R. A., Huzaifah, M. R. M., Harihastuti, N., Sapuan, S. M., Harussani, M. M., Azlin, M. N. M., Yuliasni, R., Ibrahim, R., Atikah, M. S. N., Wang, J., Chandrasekhar, K., Amirulislam, M., Sharma, S., Punia, S., Rajasekar, A., Asyraf, M. R. M., & Ishak, M. R. (2021). Use of industrial wastes as sustainable nutrient sources for bacterial cellulose (BC) production: Mechanism, advances, and future perspectives. *Polymers*, *13*(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193365>
- Kanehisa Laboratories. (2021, August 20). *KEGG PATHWAY: Galactose metabolism - Reference pathway*. <https://www.genome.jp/pathway/map00052>
- Karr, J. R., Sanghvi, J. C., MacKlin, D. N., Gutschow, M. V., Jacobs, J. M., Bolival, B., Assad-Garcia, N., Glass, J. I., & Covert, M. W. (2012). A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell*, *150*(2), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.044>
- KEGG. (2022a). *beta-1,4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.12)*. https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?enzyme+2.4.1.12

- KEGG. (2022b). *KEGG GENOME: Komagataeibacter xylinus*.
https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:gxl
- Keshk, S. M. (2014). Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>
- 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, T., Hirose, Y., Ohmiya, K., Shimizu, S., Uchrno, F., & University, I. (1978). Thermostable β -Galactosidase from *Bacillus acidocaldarius* and its immobilization. *The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan*, 56(4), 309–314.
https://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_11076833_po_ART0002962484.pdf?contentNo=1&alternativeNo=
- Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., & Yamada, Y. (1998). The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidans* subsp. nov. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(1), 185–187.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1271/bbb.62.185>
- Kubiak, K., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Ludwicka, K., & Bielecki, S. (2016). *Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy - Google Libros*. Elsevier.
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=Y1DpCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=NONBBZxJKT&sig=qkXl5e0OjWTtMq1mwk2kYl0UDBI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Kubiak, Katarzyna, Kurzawa, M., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Ludwicka, K., Krawczyk, M., Migdalski, A., Kacprzak, M. M., Loska, D., Krystynowicz, A., & Bielecki, S. (2014). Complete genome sequence of *Gluconacetobacter xylinus*

- E25 strain-Valuable and effective producer of bacterial nanocellulose. *Journal of Biotechnology*, 176(1), 18–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.006>
- Kumar, H., Finer-Moore, J., Kaback, R., & Stroud, R. (2015). Structure of LacY with an α -substituted galactoside: Connecting the binding site to the protonation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), 904–909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509854112>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Kari, Z. A., Noor, N. H. M., & Ray, R. R. (2021). Bacterial cellulose: Production, characterization and application as antimicrobial agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>
- Lammertyn, E., & Anne, J. (1997). *Modifications of Streptomyces signal peptides and their effects on protein production and secretion*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12882.x>
- Lara, A. R. (2011). Recombinant protein production in escherichia coli. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 10(2), 209–223.
- Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–175. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300002>
- 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.
- Lavine, J. E., Cantlay, E., Roberts, C. T., & Morse, D. E. (1982). Purification and properties of galactokinase from Tetrahymena thermophila. *BBA - General Subjects*, 717(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90382-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90382-8)

- 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>
- Lee, L. J., Kimura, A., & Tochikura, T. (1978). Purification and properties of hexose 1-phosphate uridylyltransferase from bifidobacterium bifidum. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(4), 723–730. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863052>
- Lee, L., Kimura, A., & Tochikura, T. (1977). Purification and Properties of Galactokinase from Bifidobacterium bifidum. *Journal of Fermentation Technology*, *55*(1), 19–26.
- Leibniz Institute. (2021). *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details*. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2004>
- Li, F., Yuan, L., Lu, H., Li, G., Chen, Y., Engqvist, M. K. M., Kerkhoven, E. J., & Nielsen, J. (2022). Deep learning-based kcat prediction enables improved enzyme-constrained model reconstruction. *Nature Catalysis*. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00798-z>
- Li, L., Liu, Y., Wang, W., Cheng, J., Zhao, W., & Wang, P. (2012). A highly efficient galactokinase from Bifidobacterium infantis with broad substrate specificity. *Carbohydrate Research*, *355*, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.04.022>
- Li, W., & Nyholt, D. R. (2001). Marker selection by Akaike information criterion and Bayesian information criterion. *Genetic Epidemiology*, *21*(SUPPL. 1), 272–277. <https://doi.org/10.1002/gepi.2001.21.s1.s272>
- Li, Y. Y., Wang, B., Ma, M. G., & Wang, B. (2018). Review of Recent Development on Preparation, Properties, and Applications of Cellulose-Based Functional Materials. *International Journal of Polymer Science*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/8973643>

- Lima, H., Nascimento, E., Andrade, F., Brígida, A., Borges, M., Cassales, A., Muniz, C., Souza, F., Morais, F., & Rosa, F. (2017). BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION BY *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 USING SISAL JUICE-AN AGROINDUSTRY WASTE. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(03), 671–680. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150514>
- Lin, S. X., Morrison, L., Smith, P. W. F., Hargood, C., Weal, M., & Yardley, L. (2016). Properties of bootstrap tests for N-of-1 studies. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 69(3), 276–290. <https://doi.org/10.1111/BMSP.12071>
- Liu, M., Li, S., Xie, Y., Jia, S., Hou, Y., Zou, Y., & Zhong, C. (2017). Enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and oxygen tension regulation. *Springer Nature*. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8680-z>
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018a). 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., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018b). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation OPEN. *Scientific Reports*, 8, 6266. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24559-w>
- Lobelle, P., & Reeves, R. (1983). Separation and characterization of two UTP-utilizing hexose phosphate uridylyltransferases from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 7, 240. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(83\)90043-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(83)90043-9)
- Lobo-Rojas, Á. E., González-Marcano, E. B., Valera-Vera, E. A., Acosta, H. R., Quiñones, W. A., Burchmore, R. J. S., Concepción, J. L., & Cáceres, A. J. (2016).

Trypanosoma cruzi contains two galactokinases; molecular and biochemical characterization. *Parasitology International*, 65(5), 472–482.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.06.008>

Lustri, W. R., Barud, H., Peres, M., Gutierrez, J., Tercjak, A., & Ribeiro, S. (2015). *Cellulose: Fundamental Aspects and Current Trends - Google Libros* (Vol. 1). InTech.

<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LmqQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA133&dq=Microbial+Cellulose+—+Biosynthesis+Mechanisms+and+Medical+Applications+By+Wilton+R.+Lustri,+Hélida+Gomes+de+Oliveira+Barud,+Hernane+da+Silva+Barud,+Maristela+F.+S.+Peres,+Junkal+Gu>

Marič, L., Cleenwerck, I., Accetto, T., Vandamme, P., & Trček, J. (2020). Description of *Komagataeibacter melaceti* sp. nov. and *Komagataeibacter melomenus* sp. nov. Isolated from Apple Cider Vinegar. *Microorganisms*, 16.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081178>

Martinez, L. (2014). Metabolismo de oligo- y polisacáridos en microorganismos. Estudio comparativo de nucleótido-azúcar pirofosforilasas. *Instituto de Agrobiotecnología Del Litoral*, 148.
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/233/tesis.pdf?sequence=1>

Mavromatis, K., Sikorski, J., Lapidus, A., Glavina Del Rio, T., Copeland, A., Tice, H., Cheng, J.-F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., ... Kyrpides, N. C. (2010). Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* type strain (104-IA T). *Standards in Genomic Sciences*, 2, 9–18.
<https://doi.org/10.4056/sigs.591104>

Mbituyimana, B., Liu, L., Ye, W., Ode Boni, B. O., Zhang, K., Chen, J., Thomas, S., Vasilievich, R. V., Shi, Z., & Yang, G. (2021). Bacterial cellulose-based composites for biomedical and cosmetic applications: Research progress and

existing products. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118565.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118565>

McCorvie, T. J., Gleason, T. J., Fridovich-Keil, J. L., & Timson, D. J. (2013). Misfolding of galactose 1-phosphate uridylyltransferase can result in type I galactosemia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1279–1293. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.04.004>

McNamara, J., Morgan, J., & Zimmer, J. (2015). A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 84, 895–921.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710354/#R21>

Medina, C. (2021). Desarrollo del modelo cinético para la producción de galactooligosacaridos GOS a partir del lactosuero usando la enzima β - galactosidasa libre e inmovilizada proveniente de *A. oryzae*. *Ciencia Unisalle*.
https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/727/?utm_source=ciencia.lasalle.edu.co%2Fing_alimentos%2F727&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages

Méndez, M., & Membrillo, J. (2004). Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 26–34.
<https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43270104> Cómo

Molinares, C., Muñoz, J. M., Carbajal, A., Hernández, A. L., Cueto, A., & Muñoz, J. (2021). Métodos de identificación molecular para *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 6(21), 28–44.
<https://www.aytbuap.mx/aytbuap-621/métodos-de-identificación-molecular-para-gluconacetobacter-diazotrophicus>

Morgan, J. L. W., Mcnamara, J. T., & Zimmer, J. (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic-di-GMP. *Nat Struct Mol Biol*, 21(5), 489–496. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2803>

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>

Nakao, M., Harada, M., Kodama, Y., Nakayama, T., Shibano, Y., & Amachi, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5), 657–663.
<https://doi.org/10.1007/BF00173325>

Nanollose ltd. (2020). *Nanollose: Nanollose es una empresa líder en investigación y desarrollo, que se especializa en el desarrollo de tecnologías de celulosa sin plantas*. <https://nanollose.com/#sustainable>

National Center for Biotechnology Information. (2014). The GenBank Submissions Handbook. *National Center for Biotechnology Information, Md*, 176.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51157/>

Navarro, M. (2018). OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE *Gluconacetobacter* sp. MEDIANTE FERMENTACIÓN DE EXTRACTOS DE FRUTAS DE DESCARTE. *UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE*, 1–106. <https://acortar.link/Qe1gpM>

NCBI-Genome. (2022). *Komagataeibacter xylinus E25 (ID 2328) - Genome - NCBI*.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2328?genome_assembly_id=172366

NCBI. (2022). *Ensamblaje del genoma de Komagataeibacter xylinus E25 ASM55076v1*.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_000550765.1/

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.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141279>

- O'Neill, I., Schofield, Z., & Hall, L. J. (2017). Exploring the role of the microbiota member Bifidobacterium in modulating immune-linked diseases. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(4), 333–349. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170058>
- Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, H., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K. ichiro, Matsushita, K., Fujita, N., & Shirai, M. (2011). Complete genome sequence of NBRC 3288, a Unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6997–6998. <https://doi.org/10.1128/JB.06158-11>
- Ohshida, T., Hayashi, J., Yoneda, K., Ohshima, T., & Sakuraba, H. (2020). Unique active site formation in a novel galactose 1-phosphate uridylyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 88(5), 669–678. <https://doi.org/10.1002/prot.25848>
- Okano, Y., Asada, M., Fujimoto, A., Ohtake, A., Murayama, K., Hsiao, K. J., Choeh, K., Yang, Y., Cao, Q., Reichardt, J. K. V., Niihira, S., Imamura, T., & Yamano, T. (2001). A genetic factor for age-related cataract: Identification and characterization of a novel galactokinase variant, “Osaka,” in Asians. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 1036–1042. <https://doi.org/10.1086/319512>
- Onishi, N., & Tanaka, T. (1995). Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4026–4030. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.4026-4030.1995>
- Pacheco, A. (2016). Aplicación de diseño experimental de respuesta de superficie box behnken para el desarrollo de una leche probiótica hidrolizada. *Universidad Del Azuay*, 142. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>
- Pacheco, C.-, Luis, J., Yee, M., Zentella, C., & Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 18–25.
- Palacios, R. (2019). Producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*,

utilizando diferentes residuos agroindustriales. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO*, 8(5), 55.
https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29839/4/AL_706.pdf

Panaitescu, D. M., Frone, A. N., Chiulan, I., Casarica, A., Nicolae, C. A., Ghiurea, M., Trusca, R., & Damian, C. M. (2016). Structural and morphological characterization of bacterial cellulose nano-reinforcements prepared by mechanical route. *Materials and Design*, 110, 790–801.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.08.052>

Pang, M., Huang, Y., Meng, F., Zhuang, Y., Liu, H., Du, M., Ma, Q., Wang, Q., Chen, Z., Chen, L., Cai, T., & Cai, Y. (2020). Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 122, 109365.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109365>

Parenteau, J., Maignon, L., Berthoumieux, M., Catala, M., Gagnon, V., & Abou Elela, S. (2019). Introns are mediators of cell response to starvation. *Nature*, 565(7741), 612–617. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0859-7>

Park, A. R., & Oh, D. K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1279–1286. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2356-2>

Park, J. K., Jung, J. Y., & Khan, T. (2009). Bacterial cellulose. In *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*. Woodhead Publishing Limited.
<https://doi.org/10.1533/9781845695873.724>

PDB. (2012). *PDB 4hg6 structure summary* < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4hg6>

PDBe. (2022). *LacY_Lactose permease complex with thiodigalactoside and nanobody 9043*. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/6vbg>

Perna M, O., Jaramillo L, R., & Gonzalez V, A. (2016). Producción de celulosa bacteriana en corozo de lata (*Bactris guineensis*): Una alternativa de

implementación en la industria alimentaria. *Vitae*, 23, S433–S437.
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84961793557&partnerID=40&md5=823e609afbedc560cad8fe0f9ff65c6f>

Perna, O. (2013). Evaluacion de la produccion de celulosa por *Acetobacter Xilimun* en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y con flujo de aire intermitente. *UNIVERSIDAD DE LA SABANA*, 99.
[https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/8314/OLGA-PERNA\(T\)-1-FINAL.pdf?sequence=3](https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/8314/OLGA-PERNA(T)-1-FINAL.pdf?sequence=3)

Pfeffer, S., Santos, R., Ebels, M., Bordbar, D., & Brown, R. M. (2017). Complete Genome Sequence of *Komagataeibacter hansenii* Strain SC-3B. *Genome Announcements*, 5(15). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00169-17>

Placier, G., Watzlawick, H., Rabiller, C., & Mattes, R. (2009). Evolved β -galactosidases from *Geobacillus stearothermophilus* with improved transgalactosylation yield for galacto-oligosaccharide production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6312–6321.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00714-09>

Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 125–147. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90060-M](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90060-M)

Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586–610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>

Pradas, J. T. (2019). Bacterial cellulose production by microorganisms of technological interest. *Universidad Zaragoza, Facultad de Veterinaria*, 46.
<https://zaguan.unizar.es/record/86871/files/TAZ-TFG-2019-4529.pdf>

Rajwade, J. M., Paknikar, K. M., & Kumbhar, J. V. (2015). Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2491–2511. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>

- Recordati, G. B. P. (2015). THE FOOD INDUSTRY : HISTORY , EVOLUTION AND CURRENT TRENDS. *Department of Business and Economics*, 33–35. <https://tesi.luiss.it/15698/1/177941.pdf>
- Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A. (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 510–524. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871>
- Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Gañan, P., de la Caba, K., & Mondragon, I. (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. *Springer Science+Business Media*, 17(3), 661–669. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9389-7>
- 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>
- Rezazadeh, M., Babaeipour, V., & Motamedian, E. (2020). Reconstruction, verification and in-silico analysis of a genome-scale metabolic model of bacterial cellulose producing *Komagataeibacter xylinus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(6), 1017–1026. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02299-4>
- Rhimi, M., Aghajari, N., Jaouadi, B., Juy, M., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., & Bejar, S. (2009). Exploring the acidotolerance of β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: an attractive enzyme for lactose bioconversion. *Research in Microbiology*, 160(10), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.09.004>
- Rigalli, A. (2019). *Transporte a través de membranas biológicas*. 67–77. [https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/7329/transporte a traves de membranas.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/7329/transporte%20a%20traves%20de%20membranas.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante

- secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Römling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology*, 153(4), 205–212. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01316-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01316-5)
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2030672/>
- Ryngajłło, M., Kubiak, K., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Jacek, P., & Bielecki, S. (2018). Comparative genomics of the Komagataeibacter strains—Efficient bionanocellulose producers. *Microbiologyopen*, 8(5). <https://doi.org/10.1002/mbo3.731>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Santos, S. (2015). Aplicación de la celulosa bacteriana a la restauración del patrimonio bibliográfico y documental en papel. *UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID, Madrid-España*, 260. https://oa.upm.es/39035/1/07_2015_SARA_MARIA_SANTOS_DE_DIOS.pdf
- Santos, S., Carbajo, J., & Villar, C. (2016). Celulosa Bacteriana. In *PANORAMA DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA Y PAPEL Y MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS* (pp. 46–63). https://www.eucalyptus.com.br/artigos/2016_Panorama_Cap04_Celulosa+Bacteriana.pdf
- Schell, M. A., & Wilson, D. B. (1977). Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 252(4), 1162–1166. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40635-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40635-1)

- Sellick, C. A., & Reece, R. J. (2006). Contribution of amino acid side chains to sugar binding specificity in a galactokinase, Gal1p, and a transcriptional inducer, Gal3p. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17150–17155. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602086200>
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured escherichia coli biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5540–5554. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>
- Siow, R. S., Teo, S. Sen, Ho, W. Y., Shukor, M. Y. A., Phang, S. M., & Ho, C. L. (2012). Molecular cloning and biochemical characterization of galactose-1-phosphate uridylyltransferase from gracilaria changii (rhodophyta). *Journal of Phycology*, 48(1), 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01105.x>
- Smart, E. L., & Pharr, D. M. (1981). Separation and characteristics of galactose-1-phosphate and glucose-1-phosphate uridylyltransferase from fruit peduncles of cucumber. *Planta*, 153(4), 370–375. <https://doi.org/10.1007/BF00384256>
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., & Lee, S.-J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), 5. <https://doi.org/10.1042/ba20000065>
- Souza, E. F., Furtado, M. R., Carvalho, C. W. P., Freitas-Silva, O., & Gottschalk, L. M. F. (2020). Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.180>
- Suárez, L., & Yañez, L. (2020). ARNr 16S como herramienta aplicada en la caracterización molecular de géneros y especies de bacterias. *Journal of Engineering Sciences*, 25(1), 127–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.22463/0122820X.2430>
- Surma, B., Danielewicz, D., & Presler, S. (2008). Properties of Composites of

- Unbeaten Birch and Pine Sulphate Pulps with Bacterial Cellulose. *Technical University of Lodz*, 16(6), 127–129. <http://www.fibtex.lodz.pl/2008/6/127.pdf>
- Szumilo, T. (1982). A galactokinase of Mycobacterium sp. 279 galactose mutant. *Acta Microbiologica Polonica*, 31(3–4), 249–256. <https://europepmc.org/article/med/6189374>
- Tait, K. (1998). Industria Farmaceutica. *Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo*, 20. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/79.pdf>
- Talbot, B., & Thirion, J. P. (1982). Isolation, purification and partial characterization of galactokinase from chinese hamster liver. *International Journal of Biochemistry*, 14(8), 719–726. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(82\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0020-711X(82)90008-8)
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Taxonomy Browser, N. (2022). *Trypanosoma cruzi* - NCBI - NLM. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/5693/>
- Taxonomy Browser, NCBI. (2020). Komagataeibacter xylinus Taxonomy ID: 1296990. NCBI, 2020. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>
- Teschke, K. (2009). Industria del papel y de la pasta de papel. *Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo*, 72,2-72,19. <https://www.insst.es/documents/94886/161971/Capítulo+72.+Industria+del+papel+y+de+la+pasta+de+papel>
- Thiele, I., & Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, 5(1), 93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>

- Thompson, D. N., & Hamilton, M. A. (2001). Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 91–93(12), 503–513. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503>
- Thompson, J., Gibson, J., & Higgins, G. (2003). *Current protocols in bioinformatics, Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX*. 1–22.
- Timson, D. J., & Reece, R. J. (2003). Sugar recognition by human galactokinase. *BMC Biochemistry*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-4-16>
- Torres, F. G., Commeaux, S., & Troncoso, O. P. (2012). Functional Biomaterials Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. *Functional Biomaterials*, 3(Lima-Perú), 864–878. <https://doi.org/10.3390/jfb3040864>
- Toscano, J. (2019). Estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, Ambato-Ecuador*, 1–9. https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/29409/3/AL_699.pdf
- 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>
- UniProt. (2022). *UniProt - P02920. LACY_ECOLI*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02920/entry#sequences>
- Vargas, J. (2013). “ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA REFRESCANTE FERMENTANDO LA SIMBIOSIS KOMBUCHA CON EL OBJETO DE MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA DE LOS CONSUMIDORES DE BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS.” *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, Ambato-Ecuador*, 15–17. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1759/1/SBQ5_Ref3399.pdf

- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>
- Vélez, M., Gañan, P., Hincapié, G., Severiche, J. D., & Restrepo, M. (2009). Use of dietary fiber from fruits and / or its waste processing in the design of products baking and corn. *Universidad Pontificia Bolivariana Medellín*, 7(2). https://pdfs.semanticscholar.org/07c1/14293e8dafeced22f7ba204ab8cb092eb3.pdf?_ga=2.114264775.118459855.1644015402-20972745.1644015402
- Vigentini, I., Fabrizio, V., Dellacà, F., Rossi, S., Azario, I., Mondin, C., Benaglia, M., & 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(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01953>
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *The Journal of Membrane Biology*, 115(3), 195–201. <https://doi.org/10.1007/BF01868635>
- Vrieze, S. I. (2012). Model selection and psychological theory: A discussion of the differences between the Akaike information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). *Psychological Methods*, 17(2), 228–243. <https://doi.org/10.1037/a0027127>
- Wang, H., Luo, H., Bai, Y., Wang, Y., Yang, P., Shi, P., Zhang, W., Fan, Y., & Yao, B. (2009). An acidophilic β -galactosidase from bisporasp. MEY-1 with high lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5535–5541. <https://doi.org/10.1021/jf900369e>
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*, 219(April), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>

- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microb Biotechnol*, *6*, 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>
- Wells, L. (1997). Biochemical characterization of the S135L allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase associated with galactosaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *20*(5), 633–642. <https://doi.org/10.1023/A:1005314207513>
- Williams, V. P., Helmer, G. R., & Fried, C. (1982). Human galactose-1-phosphate uridylyltransferase: Purification and comparison of the red blood cell and placental enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *216*(2), 503–511. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90239-9)
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoont, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D. H., Meade, J. H., Emerick, A. W., Bruner ¶, R., Ben-Bassat ¶, A., & Tal, R. (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum* (cellulose biogenesis/cloning/sequencing). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 87). <https://www.pnas.org/content/87/20/8130>
- 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>
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, *24*(9), 3141–3145. <https://doi.org/10.1007/BF01139032>
- Yáñez, G. (2016). Uso de distintos sustratos para el desarrollo de biomasa bacteriana.

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 18(2), 33–112.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.006><http://dx.doi.org/10.1016/j.neps.2015.06.001><https://www.abebooks.com/Trease-Evans-Pharmacognosy-13th-Edition-William/14174467122/bd>

Yang, Z. (1996). Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(9), 367–372. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10041-0](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10041-0)

Yuan, T., Yang, P., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., & Yao, B. (2008). Heterologous expression of a gene encoding a thermostable β -galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology Letters*, 30(2), 343–348. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9551-y>

Zerbs, S., Frank, A. M., & Collart, F. R. (2009). Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods in Enzymology*, 463(C), 149–168. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63012-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63012-3)

Zhang, Heng, Ye, C., Xu, N., Chen, C., Chen, X., Yuan, F., Xu, Y., Yang, J., & Sun, D. (2017). Reconstruction of a Genome-scale Metabolic Network of *Komagataeibacter nataicola* RZS01 for Cellulose Production OPEN. *Sci Rep*, 7, 7911. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06918-1>

Zhang, Hualin, Wang, J., Wang, K., & Xu, L. (2018). A bilayered PLGA/multiwall carbon nanotubes/bacterial cellulose composite membrane for tissue regeneration of maxillary canine periodontal bone defects. *Materials Letters*, 212, 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.10.058>

Zhong, Cheng, Zhang, G. C., Liu, M., Zheng, X. T., Han, P. P., & Jia, S. R. (2013). Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6189–6199. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8>

Zhong, Chunyan. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–19.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias 16S de *K. xylinus* implementadas en análisis filogenético

Microorganismo	Strain	Tipo de secuencia	Código de acceso
	DSM 46604		AJ316552.1
	JCM 7644		AB645737.1
	JCM 10150		AB205219.1
	NBRC 3288		AB680048.1
	NBRC 13693		AB680481.1
	NBRC 13772		AB680512.1
	NBRC 13773		AB680513.1
	NBRC 15237		AB680815.1
	NBRC 16643		AB681097.1
	NBRC 16644		AB681098.1
	NBRC 16670		AB681102.1
	NBRC 16672		AB681103.1
	NBRC 16682		AB681108.1
<i>Komagataeibacter</i>	DSM 2004	16S	GQ240638.1
<i>xylinus</i>	CAV69		JQ513828.1
	dfr1		JN619368.1
	EV11		JQ513850.1
	EVB7		JQ513852.1
	FM883		MW757206.1
	G7-3		KF030791.1
	LMG 1523		JF794015.1
	NCIB 11664		NR_036787.1
	RF		MW819869.1
	SGP8		MT250918.1
	ZUSTBC001		MK386709.1
	LMG 1515		NR_118191.1
	E25		FJ809929.1
	C18		KY315818.1

TJU-D2	MH588135.1
ATCC 53524	KX216689.1
ATCC 700178	KX216692.1
DSM 46603	MZ435949.1
CV4	AB759967.1
L96	JX283294.1
JCM 7644	AB645737.1
LGM 25	JF794012.1
OTG001	T730006.1
KTH 5655	KX216694.1
ATCC 10245	KX216690.1
XJL-06-4	MH447173.1

Nota. Código de acceso de las secuencias en NCBI

Elaborado por: Zapata K. (2021)

Anexo 2. Genomas completos de *Komagataeibacter xylinus* reportados en NCBI

Microorganismo	Strain	Código de acceso
	NBRC 15237	NZ_BCTP01000001.1
	BCRC 12334	NZ_MDVZ01000001.1
	CGMCC 2955	CP024644.1
	CGMCC 17276	NZ_CP041348.1
	DSM 2325	CP025269.1
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	E25	NZ_CP004360.1
	E26	NZ_MDTO01000001.1
	K2G30	NZ_QQBI01000001.1
	LMG 1515	NZ_NKUC01000001.1
	NBRC 13693	NZ_BANJ01000003.1
	TJU-D2	MH588135.1

Nota. Código de acceso de las secuencias en NCBI

Elaborado por: Zapata K. (2021)

Anexo 3. Porcentaje de similitud entre secuencias 16S de diferentes cepas *K. xylinus* en contraste a DSM2004 mediante BLAST

Job Title GQ240638.1 *Gluconacetobacter xylinus* strain

RID [WT5B5ES1013](#) Search expires on 12-31 00:05 am [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID lc|Query_20911

Description GQ240638.1 *Gluconacetobacter xylinus* strain DSM 2004 ...

Molecule type dna

Query Length 1305

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

exclude

Organism only top 20 will appear

Komagataeibacter xylinus

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | [Graphic Summary](#) | [Alignments](#) | [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments Download ▾ [New](#) Select columns ▾ Show 100 ▾ [?](#)

select all 24 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Gluconacetobacter xylinus strain DSM 2004 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2410	2410	100%	0.0	100.00%	1305	GQ240638.1
Komagataeibacter xylinus E25 complete genome	Komagataeibacter xylinus E25	2405	12027	100%	0.0	99.92%	3447725	CP004360.1
Komagataeibacter xylinus strain DSM 46603 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2405	2405	100%	0.0	99.92%	1469	MZ435949.1
Komagataeibacter xylinus strain OTG001 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2405	2405	100%	0.0	99.92%	1454	MT730006.1
Gluconacetobacter xylinus strain E25 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2405	2405	100%	0.0	99.92%	1452	FJ809929.1
Komagataeibacter xylinus strain CGMCC 17276 chromosome complete genome	Komagataeibacter xylinus	2399	11999	100%	0.0	99.85%	3527401	CP041348.1
Komagataeibacter xylinus strain DSM 2325 chromosome	Komagataeibacter xylinus	2399	11977	100%	0.0	99.85%	3353346	CP025269.1
Komagataeibacter xylinus strain ZHCJ618 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1390	MG451840.1
Gluconacetobacter xylinus strain 1-5 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1455	KF030727.1
Gluconacetobacter xylinus strain L96 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1477	JX283294.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: JCM 7644	Komagataeibacter xylinus NBRC 13...	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1411	AB645737.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: NBRC 15237	Komagataeibacter xylinus	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1414	AB680815.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: JCM 7644	Komagataeibacter xylinus NBRC 13...	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1445	AB205218.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: NBRC 15237	Komagataeibacter xylinus	2399	2399	100%	0.0	99.85%	1393	AB205216.1
Komagataeibacter xylinus strain TJU-D2 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2398	2398	100%	0.0	99.85%	1396	MH588135.1
Gluconacetobacter xylinus strain G7-3 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2394	2394	100%	0.0	99.77%	1455	KF030791.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: JCM 10150	Komagataeibacter xylinus	2394	2394	100%	0.0	99.77%	1445	AB205219.1
Gluconacetobacter xylinus strain CGMCC1.1812 16S ribosomal RNA gene ,partial sequ...	Komagataeibacter xylinus	2388	2388	100%	0.0	99.69%	1380	FJ599669.1
A.xylinum gene for 16S ribosomal RNA	Komagataeibacter xylinus	2383	2383	100%	0.0	99.62%	1481	X75619.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: NBRC 16682	Komagataeibacter xylinus	2374	2374	100%	0.0	99.46%	1414	AB681108.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: NBRC 13693	Komagataeibacter xylinus NBRC 13...	2372	2372	100%	0.0	99.46%	1414	AB680481.1
Komagataeibacter xylinus strain KTH 5655 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	Komagataeibacter xylinus	2362	2362	98%	0.0	99.77%	1386	KX216694.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S ribosomal RNA ,partial cds ,strain: CV4	Komagataeibacter xylinus	2362	2362	98%	0.0	99.84%	1331	AB759967.1
Gluconacetobacter xylinus gene for 16S rRNA ,partial sequence ,strain: NBRC 16672	Komagataeibacter xylinus	2361	2361	100%	0.0	99.31%	1414	AB681103.1

Anexo 4. Modelos de sustitución de nucleótidos

Model	P	BIC	AICc	lnL	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
HKY+G	82	6936.97	6211.56	-3023.65	0.17	1.53	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.2	0.05	0.14	0.07	0.05	0.12	0.07	0.14	0.04	0.05
TN93+G	83	6937.63	6203.38	-3018.55	0.18	1.52	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.04	0.14	0.05	0.2	0.07	0.05	0.17	0.07	0.1	0.04	0.04
T92+G	80	6940.75	6233.03	-3036.39	0.17	1.51	0.22	0.22	0.28	0.28	0.04	0.06	0.17	0.04	0.17	0.06	0.04	0.13	0.06	0.13	0.04	0.06
HKY+G+I	83	6943.74	6209.49	-3021.61	0.69	1.55	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.2	0.05	0.14	0.07	0.05	0.12	0.07	0.14	0.04	0.05
K2+G	79	6944.81	6245.93	-3043.84	0.17	1.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05
TN93+G+I	84	6944.84	6201.74	-3016.73	0.67	1.54	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.04	0.14	0.05	0.2	0.06	0.05	0.17	0.06	0.1	0.04	0.04
T92+G+I	81	6947.58	6231.02	-3034.38	0.69	1.52	0.22	0.22	0.28	0.28	0.04	0.06	0.17	0.04	0.17	0.06	0.04	0.13	0.06	0.13	0.04	0.06
K2+G+I	80	6951.75	6244.03	-3041.89	0.69	1.52	0.25	0.25	0.25	0.25	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05
GTR+G	86	6962.32	6201.54	-3014.62	0.18	1.29	0.24	0.20	0.23	0.34	0.06	0.04	0.14	0.07	0.17	0.09	0.04	0.15	0.05	0.1	0.05	0.03
TN93+I	83	6964.64	6230.39	-3032.06	n/a	1.43	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.14	0.05	0.19	0.07	0.05	0.16	0.07	0.1	0.04	0.05
HKY+I	82	6964.77	6239.37	-3037.55	n/a	1.43	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.2	0.05	0.13	0.07	0.05	0.12	0.07	0.14	0.04	0.05
GTR+G+I	87	6965.53	6195.91	-3010.81	0.65	1.51	0.24	0.20	0.23	0.34	0.06	0.04	0.14	0.07	0.2	0.09	0.04	0.17	0.03	0.1	0.05	0.02
T92+I	80	6968.04	6260.32	-3050.03	n/a	1.43	0.22	0.22	0.28	0.28	0.04	0.06	0.17	0.04	0.17	0.06	0.04	0.13	0.06	0.13	0.04	0.06
K2+I	79	6971.93	6273.05	-3057.40	n/a	1.43	0.25	0.25	0.25	0.25	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05
JC+G	78	6982.38	6292.34	-3068.05	0.17	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
TN93	82	6985.38	6259.97	-3047.85	n/a	1.40	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.14	0.05	0.18	0.07	0.05	0.16	0.07	0.1	0.04	0.05
HKY	81	6985.64	6269.07	-3053.41	n/a	1.40	0.24	0.20	0.23	0.34	0.04	0.05	0.19	0.05	0.13	0.07	0.05	0.12	0.07	0.14	0.04	0.05
T92	79	6988.71	6289.83	-3065.79	n/a	1.40	0.22	0.22	0.28	0.28	0.04	0.06	0.17	0.04	0.17	0.06	0.04	0.13	0.06	0.13	0.04	0.06
JC+G+I	79	6988.91	6290.03	-3065.89	0.69	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
GTR+I	86	6989.84	6229.06	-3028.38	n/a	1.23	0.24	0.20	0.23	0.34	0.06	0.04	0.14	0.07	0.16	0.09	0.04	0.14	0.05	0.1	0.05	0.04
K2	78	6992.48	6302.45	-3073.10	n/a	1.40	0.25	0.25	0.25	0.25	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05	0.15	0.05	0.15	0.05	0.05
GTR	85	7007.20	6255.26	-3042.49	n/a	1.41	0.24	0.20	0.23	0.34	0.06	0.04	0.14	0.07	0.18	0.09	0.04	0.16	0.04	0.1	0.05	0.02
JC+I	78	7010.35	6320.31	-3082.04	n/a	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
JC	77	7031.19	6350.00	-3097.88	n/a	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

Nota. Se consideró los modelos con puntuaciones BIC bajas, las cuales corresponden al criterio de información bayesiano y describen el mejor patrón de sustitución. De forma que cada modelo presenta los siguientes criterios: Valor de máxima verosimilitud (lnL), distribución gamma discreta (+G), sitios evolutivamente invariables (+I), sesgo de transición/transversión (R) y frecuencia de nucleótidos (f), además de las tasas de sustitución de las bases (r). Cabe mencionar que los valores ML, fueron obtenidos automáticamente mediante una topología de árbol, donde dicho análisis involucró 40 secuencias que codifican para el gen 16S ribosomal.

Elaborado por: Zapata K. (2021)

Anexo 5. Modelo de sustitución de nucleótidos HKY+G

From\To	A	T	C	G
A	-	0.039972617	0.045795644	0.200997945
T	0.047283449	-	0.137254679	0.067063873
C	0.047283449	0.119802413	-	0.067063873
G	0.141713797	0.039972617	0.045795644	-

Nota. Matriz de modelo con mejor patrón de sustitución

Elaborado por: Zapata K. (2021)

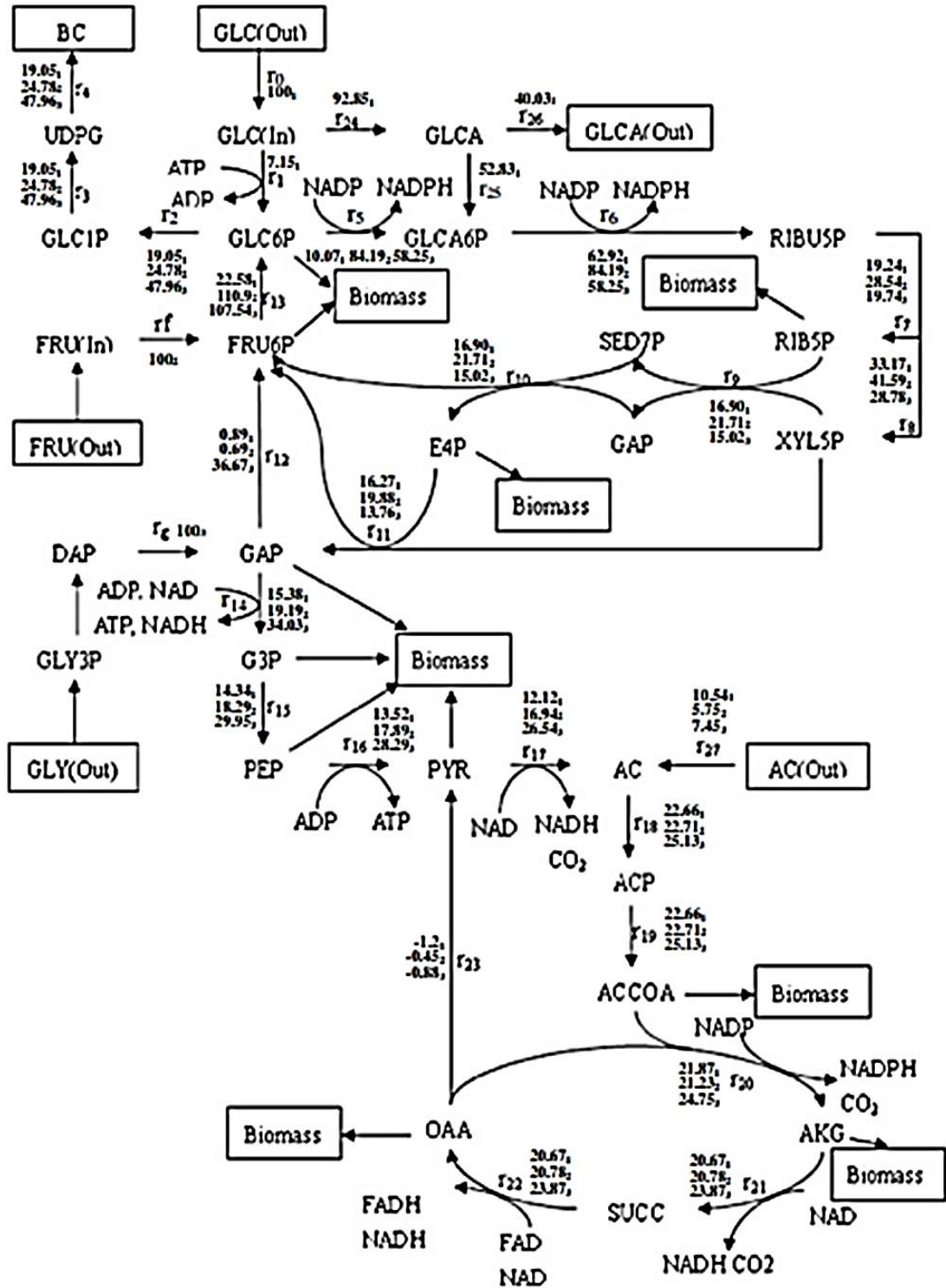
Anexo 6. Cromosoma y plásmidos del genoma de *Komagataeibacter xylinus* E25

Molécula	Longitud (pb)	Contenido GC (%)	Código de acceso		
			GenBank	RefSeq	
Cromosoma	3447725	62,50	CP004360.1	NZ_CP004360.1	
pGX1	5531	55,50	CP004361.1	NZ_CP004361.1	
pGX2	2216	56.50	CP004362.1	NZ_CP004362.1	
Plásmido	pGX3	26296	59,00	CP004363.1	NZ_CP004363.1
	pGX4	87176	59,00	CP004364.1	NZ_CP004364.1
	pGX5	336138	58,00	CP004365.1	NZ_CP004365.1

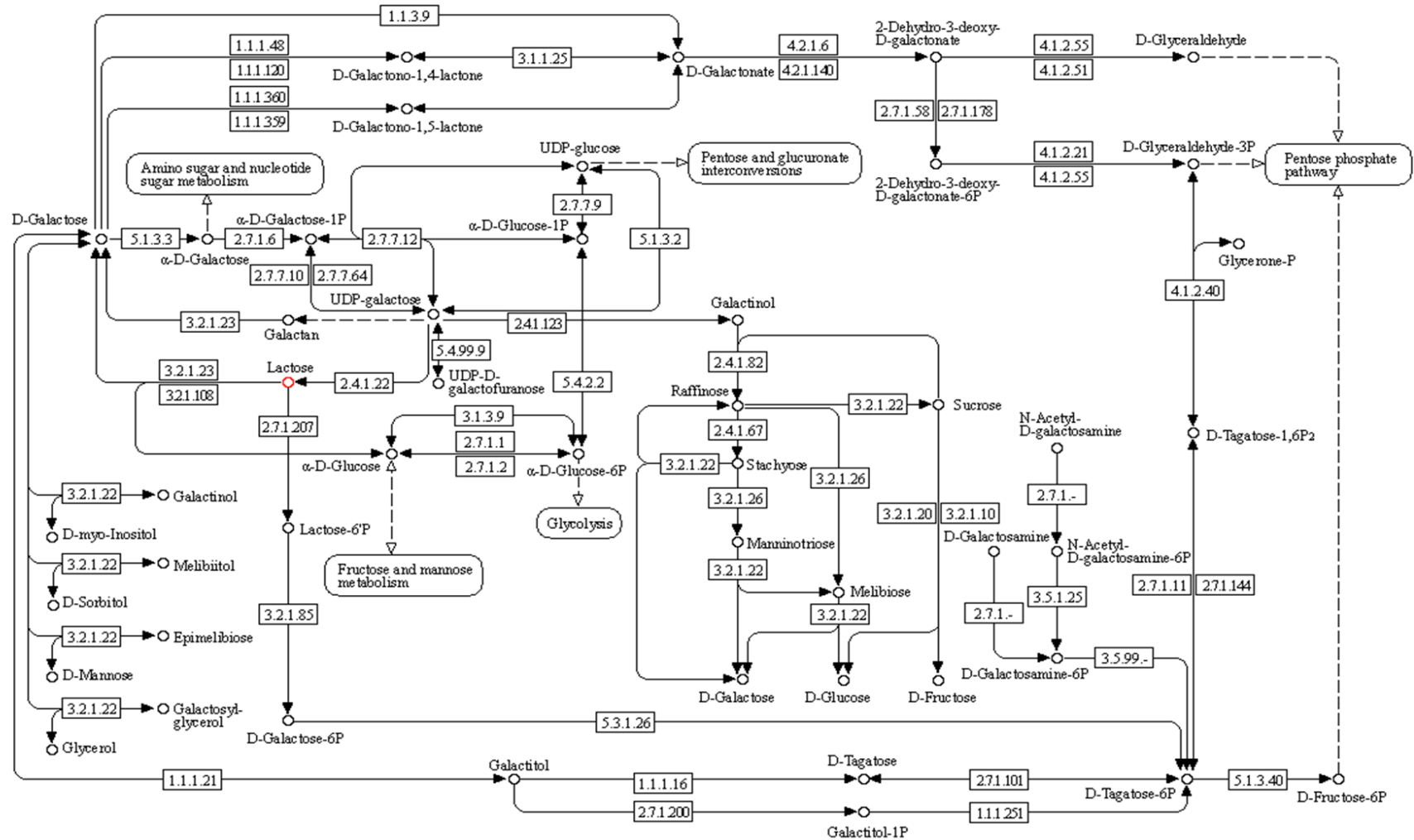
Nota. Estadísticas generales

Elaborado por: Zapata K. (2021), información obtenida de (NCBI, 2022)

Anexo 7. Biosíntesis de celulosa bacteriana a partir de múltiples fuentes de carbono



Anexo 8. Metabolismo de lactosa / galactosa en bacterias ácido lácticas



Anexo 9. Control positivo (genes encargados de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada)

Gen	Enzima	Código de acceso	Operón
<i>ilvB</i>	Subunidad grande acetolactato sintasa	WP_025437140.1	<i>ilv-leu</i>
<i>ilvC</i>	Cetol-ácido reductoisomerasa	WP_025437142.1	
<i>ilvN</i>	Subunidad pequeña acetolactato	WP_025437141.1	
	sintasa		

Anexo 10. Resultados completos de la β -galactosidasa obtenidos de la base de datos BRENDA

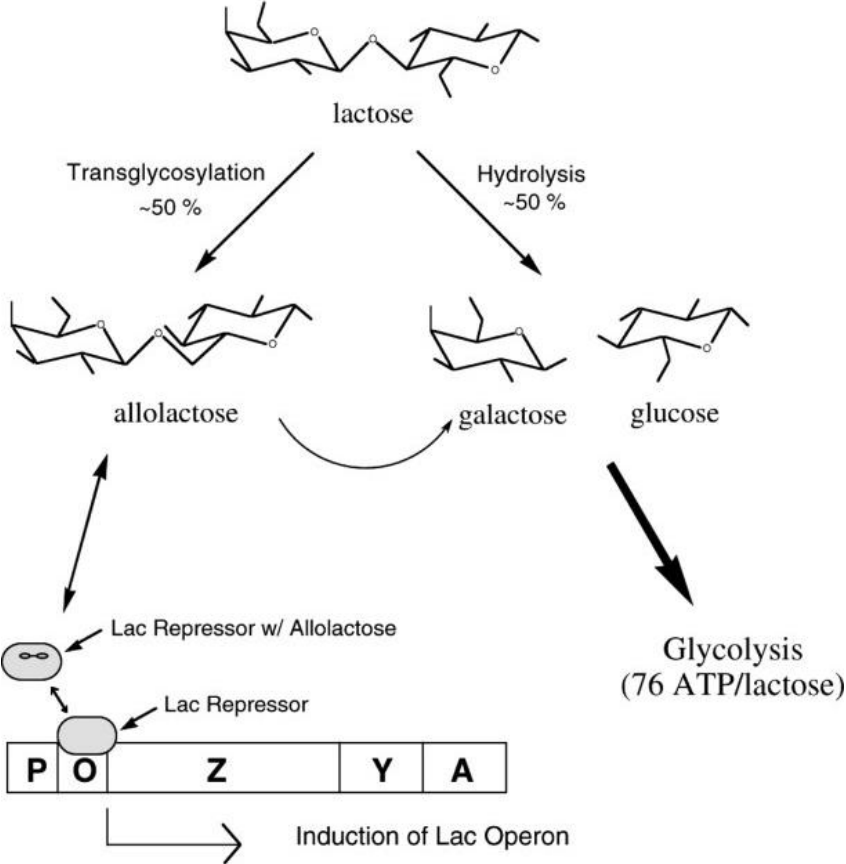
Nº	Organismo	Sustrato	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})
1	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>		0,10 - 0,80	212,00
2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		0,11 – 114,00	-
3	<i>Bispora sp.</i>		0,31 - 6,18	-
4	<i>Hamamotoa singularis</i>		0,58	-
5	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Lactosa	0,70 - 0,75	63,00 - 63,10
6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0,94 - 0,98	45,70 - 46,30
7	<i>Sterigmatomyces elviae</i>		2,40	-
8	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>		2,40	33,00
9	<i>Trichoderma reesei</i>		2,66 – 19,01	-

10	<i>Pisum sativum</i>	3,03 - 4,11	55,10
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,00 - 4,04	632,00
12	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	4,00 - 16,70	6300
13	<i>Treponema phagedenis</i>	5,40	-
14	<i>Escherichia coli</i>	5,50	-
15	<i>Actinomyces viscosus</i>	6,00	-
16	<i>Streptococcus sp.</i>	6,25	-
17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7,00 - 138,00	-
18	<i>Arthrobacter sp.</i>	7,50 - 77,54	1,76 - 18,70
19	<i>Raphanus sativus</i>	8,55	-
20	<i>Aspergillus niger</i>	8,70 - 125,00	-
21	<i>Kluyveromyces lactis</i>	8,70 - 21,00	-
22	<i>Penicillium multicolor</i>	8,90	-
23	<i>Bacteroides polypragmatus</i>	9,09	-
24	<i>Papiliotrema laurentii</i>	11,40	-
25	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	12,00 - 60,00	13,00 - 58,00
26	<i>uncultured soil bacterium</i>	12,20 - 58,60	33,00 - 141,00
27	<i>Priestia megaterium</i>	12,60	-
28	<i>Saccharolobus solfataricus</i>	13,00 - 31,80	1,90 - 167,50

29	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	13,00 - 800	-
30	<i>Lactobacillus crispatus</i>	14,20	-
31	<i>Corynebacterium murisepticum</i>	16,70	-
32	<i>Aspergillus oryzae</i>	18,00 - 85,00	869,00
33	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	18,20	-
34	<i>Thermus sp.</i>	19,00 - 43,00	12,50
35	<i>Thermomyces dupontii</i>	19,00 - 21,00	-
36	<i>Saccharomyces fragilis</i>	21,00	-
37	<i>Penicillium citrinum</i>	25,00	-
38	<i>Torulopsis sphaerica</i>	25,00	-
39	<i>Lactobacillus plantarum</i>	29,00	98,00
40	<i>Paenibacillus macerans</i>	30,00	-
41	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	30,00	42,00
42	<i>Achatina achatina</i>	30,00	-
43	<i>Trametes cinnabarina</i>	33,00	-
44	<i>Rattus norvegicus</i>	34,00	-
45	<i>Aspergillus aculeatus</i>	35,00	254,00
46	<i>Thermus aquaticus</i>	36,00 - 60,00	-

47	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	38,00	20,00
48	<i>Bacillus circulans</i>	41,70	-
49	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	42,10	3,00 - 3,02
50	<i>Bacillus sp.</i>	48,80	-
51	<i>Phaseolus vulgaris</i>	50,00 - 50,50	-
52	<i>Bacillus coagulans</i>	50,00	-
53	<i>Rhizomucor sp.</i>	50,00	-
54	<i>Caldariella acidophila</i>	61,50	-
55	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	64,00	-
56	<i>Aspergillus carbonarius</i>	83,00 - 309,00	13,00 - 55,00
57	<i>Tenebrio molitor</i>	250,00	1,20

Anexo 11. *Actividades enzimáticas de la β-galactosidasa*



Fuente: (Juers et al., 2012)

Anexo 12. Resultados completos de la galactoquinasa reportados en la base de datos BRENDA

N°	Organismo	Sustrato	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)
1	<i>Trypanosoma cruzi</i>		0,09 - 0,11	0,38
2	<i>Homo sapiens</i>		0,10 – 13,00	0,40 - 8,70
3	<i>Cricetulus griseus</i>		0,12	-
4	<i>Pyrococcus horikoshii</i>		0,40	0,91
5	<i>Vacia faba</i>		0,50	-
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		0,53 - 0,60	22,30 - 55,80
7	<i>Sus scrofa</i>	D - galactosa	0,58	
8	<i>Tetrahymena thermophila</i>		0,60	-
9	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>		0,89	146,00
10	<i>Mycobacterium sp.</i>		1,00	-
11	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		1,11 - 1,85	-
12	<i>Escherichia coli</i>		2,09 - 5,87	-
13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		37,23	2,61

Fuente: (BRENDA, 2022d)

Anexo 13. Resultados completos de la Galactosa-1-P-uridiltransferasa obtenidos de la base de datos BRENDA

Nº	Organismo	Sustrato	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)
1	<i>Homo sapiens</i>		0,011 - 1,18	3,50 - 98
2	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>		0,08	-
3	<i>Gracilaria changii</i>		0,12	-
4	<i>Escherichia coli</i>	α - D - galactosa - 1 - fosfato	0,13 - 1,54	0,05 - 780,00
5	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		0,30 - 6,66	-
6	<i>Galdieria sulphuraria</i>		0,40	-
7	<i>Entamoeba histolyca</i>		0,42	-
8	<i>Cucumis sativus</i>		1,20	-
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		4,00	987,00

Fuente: (BRENDA, 2022b, 2022f)

Anexo 14. Genes involucrados en el metabolismo de lactosa seleccionados para la producción heteróloga de proteínas

Enzima	Gen	Microorganismo	Cepa	Región del genoma	Código de acceso
Permeasa lactosa	<i>lacY</i>	<i>Escherichia coli K-12</i>	C3026	De 336589 a 337842	NZ_CP014272.1
β - galactosidasa	ATCC 27009	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ATCC 27009	De 538 a 2,604	DQ887754.1

Galactoquinasa	<i>Blon_2026</i>	<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i>	ATCC 15697	De 2213994 a 2215160	P001095.1
Galactosa-1-P-uridiltransferasa	<i>galT</i>	<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	De 8,592 a 9,638	QZA45581.1

Nota. Resultado indefinido (-); Código de acceso (“GenBank”)

Anexo 15. Red metabólica de biogénesis de celulosa a partir de lactosa en *Komagataeibacter xylinus*

