

## CELULOSA BACTERIANA EN *GLUCONACETOBACTER XYLINUM*: BIOSÍNTESIS Y APLICACIONES

Juan Luis Chávez-Pacheco, Suri Martínez-Yee,  
Martha Contreras-Zentella y Edgardo Escamilla-Marván\*

Depto. de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apdo. Postal 70-242,  
C.P. 04510, Ciudad Universitaria, México, D.F. E-mail: eescami@ifc.unam.mx

### RESUMEN

La celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza y posee gran importancia a nivel industrial; es sintetizada por una variedad de organismos, incluyendo plantas, algas, hongos, bacterias y animales. *Gluconacetobacter xylinum* es la bacteria con mayor capacidad productora de celulosa y es el organismo modelo en la investigación sobre los procesos que regulan la biosíntesis del polímero. El presente documento ofrece una revisión de los progresos en la comprensión del proceso de síntesis de celulosa, las características particulares de la celulosa bacteriana como fuente alterna a la celulosa vegetal y sus aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras Clave:** Biosíntesis celulosa, celulosa bacteriana, *Gluconacetobacter xylinum*.

### ABSTRACT

Cellulose is the most abundant organic molecule in nature and it is of great importance for industry; it is synthesized by a variety of organisms, including plants, algae, fungi, bacteria and animals. *Gluconacetobacter xylinum* is the bacterium with the highest rate of cellulose production and it constitutes the model organism in research on the biosynthesis of polymer. This paper offers a review of the progress in the understanding of the process of cellulose synthesis, particular characteristics of the bacterial cellulose as alternative source to vegetal cellulose and its biotechnological applications.

**Key Words:** Cellulose biosynthesis, bacterial cellulose, *Gluconacetobacter xylinum*.

### INTRODUCCIÓN

La celulosa es la molécula natural de mayor abundancia, anualmente se producen  $10^{11}$  a  $10^{12}$  toneladas a partir de fuentes de origen vegetal. Este polímero es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas. Organismos pertenecientes a diferentes reinos son capaces de sintetizarla. La celulosa es una materia prima de múltiples propósitos: es material de construcción, generación de fibras textiles y fabricación de papel, además, sus derivados (ésteres, acetatos, nitratos) están implicados en diversos procesos industriales.

Actualmente, la celulosa puede obtenerse de diversas fuentes:

- 1) de origen vegetal, procedente de plantas leñosas (de mayor empleo e importancia a nivel industrial);
- 2) de organismos de diferentes reinos: Fungi (*Dictyostelium*),

- Monera (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*), Animal (*Tunicidae*);
- 3) vía síntesis enzimática *in vitro*<sup>1,2</sup>; y
- 4) síntesis química *in vitro* a partir de derivados de glucosa bencilados<sup>3</sup>.

La síntesis *in vitro* mediante reacción química permite la obtención de cantidades mínimas de polímero, su perfeccionamiento puede llevarla a ser una alternativa a la celulosa vegetal. La celulosa bacteriana (CB) por su pureza y estructura cristalina destaca como fuente alterna a la de origen vegetal. En esta revisión presentamos los avances en la biosíntesis de CB (bioquímica, molecular y estructural) y su relevancia en aplicaciones biotecnológicas.

### ***Gluconacetobacter xylinum*: EL ORGANISMO MODELO**

La producción de CB en el reino Monera está diversificada, la síntesis se observa en especies dentro de los géneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea*

y *Gluconacetobacter*, a este último pertenece *G. xylinum*, la especie con mayor capacidad productora. Esta bacteria es el arquetipo para el estudio de biogénesis de CB, ya que el producto es de alta pureza y de estructura similar a la de origen vegetal<sup>4</sup>. Las ventajas obvias para manipulación y estudio del proceso de biosíntesis, han hecho de *G. xylinum* un modelo único.

*Gluconacetobacter xylinum* (anteriormente *Acetobacter xylinum*)<sup>5</sup>, es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*; aerobio estricto que realiza la oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes (proceso conocido como fermentación oxidativa). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición; es capaz de producir CB sobre medios líquidos y sólidos formando una "película" o "nata" sobre la superficie.

La película de CB funciona como mecanismo de "flotación", permitiéndole a *G. xylinum* estar en la interfase aire/líquido para obtener con mayor facilidad el O<sub>2</sub> necesario para su crecimiento. La película es una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y su carácter altamente higroscópico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato<sup>6</sup>.

### Condiciones de cultivo

El cultivo de *G. xylinum* para la producción de celulosa se practica en condiciones estáticas como en la producción del postre filipino *nata de coco*<sup>7</sup> o en cultivo agitado con fines biotecnológicos<sup>8,9</sup>. El rango de temperatura óptima para los cultivos es de 28-30° C, aunque la producción se lleva a cabo de 20 a 35° C, el pH del medio de cultivo puede variar de 4.0 a 6.0, el pH óptimo es dependiente de la cepa productora<sup>10</sup>.

La composición del medio de cultivo es variable acorde con la cepa utilizada en el sistema, los carbohidratos son la fuente de

carbono adecuada para la síntesis de CB, se reporta la producción de CB en medios conteniendo sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, manitol<sup>11,12</sup>; la bacteria puede sintetizar glucosa *de novo* a partir de ácido láctico o ácido succínico. El extracto de levadura es la fuente de nitrógeno de mayor empleo para el crecimiento de *G. xylinum*; peptona, polipeptona, triptona, licor de maíz y sulfato de amonio son también utilizados en la producción de CB. Es común la adición de fosfato de sodio o potasio para amortiguar los cambios de pH y se reporta la adición de sulfato o cloruro de magnesio<sup>11,12</sup>.

Los periodos de incubación son dependientes del sistema de cultivo, en cultivo agitado lapsos de 24 a 72 h son empleados para la producción. El cultivo estático se caracteriza por largos periodos de cultivo que van de una a dos semanas.

### CELULOSA BACTERIANA

La celulosa de cualquier fuente, incluyendo la CB, es un polímero de residuos de glucosa unidos por enlace covalente entre el carbono 1 y el 4 ( $\beta_{1-4}$ ) formando una cadena lineal. Las cadenas lineales del polímero se asocian (cristalizan) por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La asociación de cadenas (al menos 10) forma una estructura denominada "microfibrillas" de celulosa (Figura 1).

Dos características son particulares de las microfibrillas de CB: su polaridad es unidireccional y son de grosor variable. El mecanismo de cristalización de las microfibrillas en *G. xylinum* puede dar origen a dos aloformas de celulosa: si las microfibrillas se orientan en forma paralela se sintetiza celulosa I, mientras que si el arreglo de las microfibrillas es antiparalela se obtiene celulosa II.

La aloforma predominante en la naturaleza es la celulosa I, sin embargo, bajo algunas condiciones se sintetiza celulosa II; el

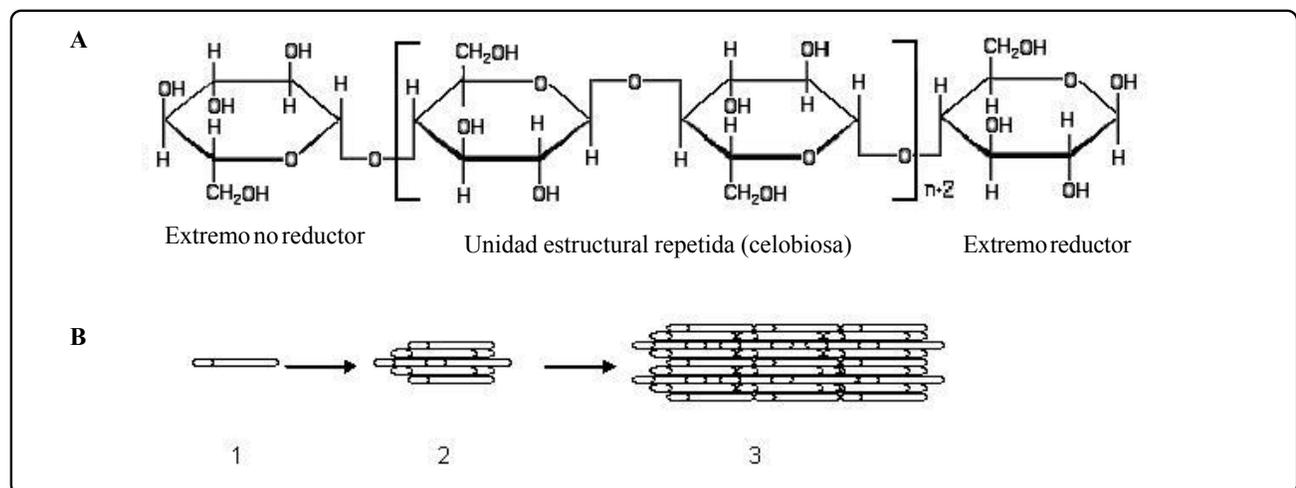


Figura 1. Panel A. Estructura molecular de la CB. Panel B. Microestructuras de CB. 1. Cadena lineal de CB. 2. Microfibrilla de CB. 3. Paquete de microfibrillas.

tratamiento químico de la celulosa I o II (proceso de mercurización industrial) da lugar a otras aloformas denominadas celulosa III y IV<sup>13</sup> diferenciadas por su estructura cristalina. La microestructura de la CB está conformada por microfibrillas con un diámetro de 4 a 7 nm y un grado de polimerización de 2,000 hasta 14,000 moléculas de glucosa<sup>14,15</sup>. Las microfibrillas a su vez cristalizan en paquetes y cintas, las cuales alcanzan un grosor de 1 a 9  $\mu\text{m}$  y forman una extensa estructura reticulada estabilizada por puentes de hidrógeno<sup>16</sup>. La condensación de las cintas da lugar a la estructura tridimensional o macroestructura de la CB.

La macroestructura de la CB es totalmente dependiente de las condiciones de cultivo; en condiciones de cultivo estático se genera una "película" o "nata" en la interfase aire/líquido del medio de cultivo. Las microfibrillas que son continuamente liberadas por la bacteria, se cristalizan en cintas, las cuales se sobrelapan formando planos paralelos<sup>17</sup>. En cultivo agitado, se logra un menor grado de agrupamiento, la cantidad de planos paralelos es menor y en consecuencia se forman gránulos irregulares, cadenas fibrosas o ramificadas de CB<sup>18</sup> (Figura 2).

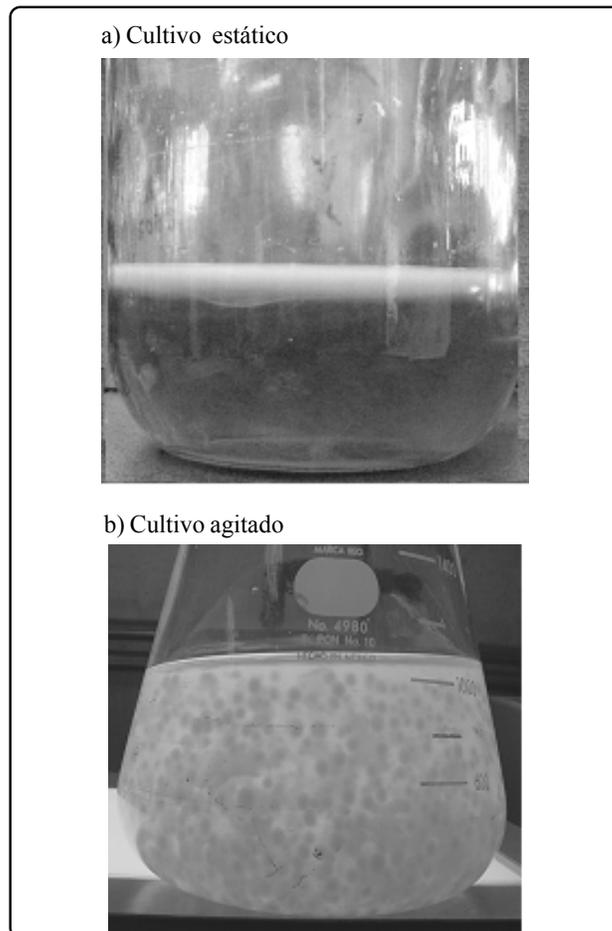


Figura 2. Macroestructuras de CB Panel a) Película de CB en cultivo estático, b) gránulos de CB en cultivo agitado.

### Características de la celulosa bacteriana

En general, la CB es estable en soluciones básicas pero es susceptible a hidrólisis alcalina bajo condiciones drásticas (NaOH 1 M, 170°C). Diversos agentes oxidantes pueden afectar sus propiedades al romper las cadenas y alterar la estructura.

El mecanismo de síntesis de CB le confiere una pureza superior a la presente en cualquier fuente vegetal (Cuadro I)<sup>19</sup>, lo cual le otorga características sólo presentes en la celulosa de origen bacteriano: alto grado de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. La celulosa tiene alta capacidad para absorber agua y debido a un menor diámetro de las microfibrillas, la CB posee una mayor área superficial que la presente en la celulosa de madera. Además de estas propiedades fisicoquímicas de importancia industrial, la CB es inerte metabólicamente, no tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto, propiedades de particular importancia para fines biomédicos y cosméticos<sup>20</sup>.

Fuente	Composición (%)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extracto
Bacteriana	98	0	0	0
Algodón	95	2	1	0.4
Henequén	78	4-8	13	4
Ixtle	73	4-8	17	2
Madera	43-47	23-35	16-24	2-8
Bagazo	40	30	20	10

Cuadro I. Contenido de celulosa de diferentes fuentes vegetales en comparación con la celulosa bacteriana. Adaptado de Klemm *et al.*, 2002<sup>19</sup>

### BIOGÉNESIS DE CELULOSA

Por más de tres décadas, diferentes grupos de investigación han trabajado para caracterizar la enzima responsable de la síntesis de las cadenas de CB y cómo éstas son excretadas y ensambladas para formar una película. El grupo de Hestrin<sup>21</sup> fue el pionero en los trabajos con *G. xylinum*, estableció las condiciones óptimas de cultivo y las rutas básicas en el metabolismo del carbono; posteriormente los estudios de Colvin<sup>22</sup> sentaron las bases en los aspectos morfológicos y estructurales de la película de CB y el grupo de Glaser<sup>23</sup> demostró que la síntesis de CB estaba asociada a la membrana plasmática.

En 1964, Preston propuso la "hipótesis del gránulo ordenado" en la cual las enzimas de síntesis conformaban complejos para generar cadenas de glucano en conjunto; estas cadenas se autoasocian en el proceso de extrusión. El grupo de Brown<sup>24</sup> identificó estos complejos en la membrana plasmática por la técnica de criofractura. Los complejos terminales de *G. xylinum* muestran un arreglo lineal y son los sitios de extrusión del polímero<sup>25</sup>. Los más importantes avances en el entendimiento de la biosíntesis de CB han ocurrido en los últimos veinte años.

### Bioquímica de la biosíntesis

Para la biosíntesis de CB dos vías anfibólicas importantes operan en esta bacteria: el ciclo de las Pentosas fosfato y el ciclo de Krebs<sup>26</sup>. El primero participa en la oxidación de carbohidratos mientras el segundo oxida ácidos orgánicos. La glucólisis no es operante debido a la carencia en la enzima fosfofructocinasa 1, que es responsable de la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6- bifosfato. La bacteria es capaz de producir glucosa *de novo* a partir de sustratos como glicerol, citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs mediante gluconeogénesis y puede convertir hexosas fosfato (fructosa, manosa) a glucosa-6-fosfato, para la síntesis del polisacárido<sup>27</sup>.

La ruta biosintética de CB en *G. xylinum* está bien entendida: la producción del polisacárido se realiza a partir de glucosa transportada desde el exterior u obtenida de fuentes internas (Ver Figura 3), la cual es fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la enzima glucocinasa. En seguida, glucosa-6-fosfato se convierte a glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa; la UDPG-pirofosforilasa a partir de glucosa-1-fosfato y en presencia uridín trifosfato (UTP) cataliza la producción de UDP-glucosa; este nucleótido azúcar es el sustrato de la enzima celulosa sintasa (CS)<sup>28</sup> (Figura 3).

Existe controversia acerca de la forma en la que el sustrato es utilizado por la CS; una hipótesis implica la asociación de UDP-glucosa a lípidos de la membrana plasmática<sup>29,30</sup> mientras la otra variante<sup>31</sup> considera que el precursor soluble interactúa directamente con la CS. No existen datos contundentes para validar alguna de estas propuestas.

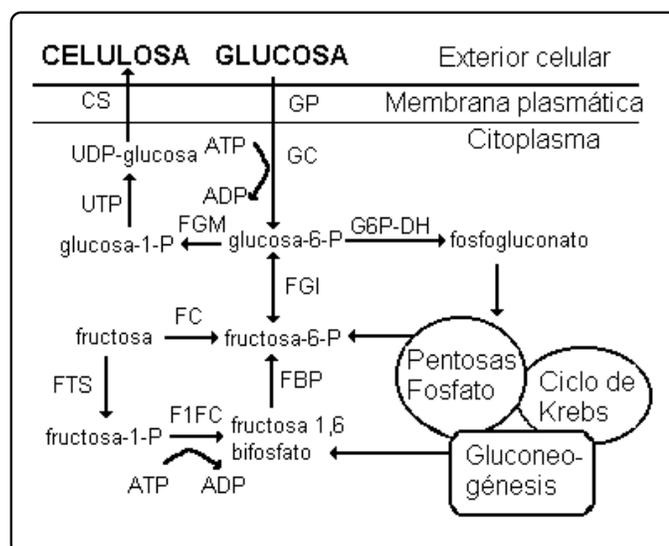


Figura 3. Rutas metabólicas y de síntesis de celulosa en *G. xylinum*. CS, celulosa sintasa; FBP, fructosa bifosfatasa; FC, fructocinasa; F1FC, fructosa-1-P cinasa, FGI, fosfoglucoisomerasa; FGM, fosfoglucomutasa; FTS, fosfofructotransferasa; GC, glucocinasa; GP, glucosa permeasa; G6P-DH, glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP, uridín difosfato glucopirofosforilasa.

La reacción global en la síntesis de CB implica el gasto de dos enlaces de alta energía por cada residuo de glucosa añadido al polímero (proceso energéticamente costoso), lo cual consume hasta un 10% del ATP generado por el metabolismo. El aporte energético para la síntesis proviene del metabolismo aerobio, por lo cual la cadena respiratoria juega un papel importante en la síntesis de CB.

El flujo de carbono hacia CB o al ciclo de pentosas parece estar regulado por el estado energético celular, un punto crucial es la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; en *G. xylinum* existen dos isoenzimas, una de las cuales se inactiva a alta concentración de ATP y favorece el flujo de carbono hacia la síntesis del polisacárido<sup>32</sup>.

### Genes para la biosíntesis

La purificación e identificación de la CS facilitó la identificación de los genes que la codifican. El complejo de la CS está conformado por cuatro subunidades proteicas denominadas A, B, C y D, las cuales se encuentran codificadas en el operón *bcs*<sup>33</sup> (por sus siglas en inglés bacterial cellulose synthesis) en el cromosoma de *G. xylinum*.

El análisis funcional indica que la subunidad A (83 kDa), contiene el sitio catalítico de la enzima<sup>34</sup>. El análisis comparativo con subunidades catalíticas de diferentes CS indica una similitud superior al 70%<sup>35</sup> en la secuencia de aminoácidos de estas enzimas. La función de la subunidad B (90 kDa), es la de unir al regulador alostérico positivo, el ácido cíclico bis(2',5') diguanílico (c-di-GMP) y así aumentar la velocidad de síntesis del polímero.

Las subunidades C y D (138 y 17 kDa, respectivamente), parecen poseer función estructural. Cepas mutantes en el gen de la subunidad D generan celulosa tipo II, indicando que esta subunidad no participa en la síntesis de CB pero está implicada en el proceso de cristalización. Ha sido reportado un segundo operón en el genoma de *G. xylinum* con genes para la producción de CB<sup>36</sup>, cuyos productos proteicos son funcionales y se han publicado revisiones detalladas de la biología molecular de la síntesis de celulosa en *G. xylinum* y otras bacterias.<sup>35,37</sup>

La CS es una proteína integral de membrana, en su conjunto, las cadenas polipeptídicas cruzan de ocho a diez veces la membrana, con una región globular que contiene el sitio catalítico. El alineamiento de la CS con miembros de la familia de  $\beta$ -glicosil transferasas, muestra cuatro residuos de aspartato y un motivo QXXRW altamente conservados. Este motivo se observa en todas las  $\beta$ -glicosil transferasas aditivas, esto es, que transfieren más de un residuo de azúcar a la vez; las  $\beta$ -glicosil transferasas no aditivas (que transfieren un residuo de azúcar por reacción) poseen sólo tres residuos de aspartato conservados.

Las propiedades catalíticas de la enzima se han evaluado en su estado solubilizado y embebida en la membrana, en ambas formas se observa dependencia por el  $Mg^{+2}$ . El rango de pH óptimo es de 7.5 a 8.5, su temperatura óptima es de 30°C y muestra un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten con respecto a UDP-glucosa ( $K_m = 125 \mu M$ ). La CS se inhibe competitivamente por uridín 5 fosfatos (UTP o UDP,  $K_i = 14 \mu M$ , UMP  $K_i = 71 \mu M$ )<sup>26</sup>. Tanto solubilizada como unida a membrana, la enzima se muestra sensible al regulador alostérico c-di-GMP incrementando la velocidad de reacción en un factor de hasta 200 veces<sup>26</sup>.

Además de la CS, dos genes río arriba del operón *bcs* son requeridos en la biosíntesis. El primero codifica para una  $\beta_{1,4}$  endoglucanasa, cuya función sería la terminación de una cadena de CB; el segundo, codifica para una proteína rica en prolina de función desconocida. La interrupción de ambos genes provoca la pérdida de la capacidad de síntesis *in vivo* pero no *in vitro*<sup>38</sup>.

Otro factor proteico asociado a la síntesis, es la proteína de unión a c-di-GMP<sup>39</sup>, la cual se asume regula la concentración del regulador alostérico en forma libre y a su vez lo canaliza a la CS. Existe controversia sobre la existencia de esta proteína, existe la posibilidad de que sea un producto de degradación de la subunidad B de la CS, la cual también une a c-di-GMP, esta disyuntiva no ha sido resuelta<sup>38</sup>.

Finalmente, los genes que codifican para la síntesis y degradación del regulador alostérico c-di-GMP tienen un papel relevante. El genoma de *G. xylinum* contiene tres operones *cdg* conteniendo un gen *pdeA* y un gen *dgc*, los cuales codifican a la fosfodiesterasa A y a la diguanilato ciclasa, respectivamente.

La diguanilato ciclasa cataliza la síntesis de c-di-GMP a partir de GTP y la fosfodiesterasa A participa en la degradación. Es interesante que ambas se encuentren ubicadas en el mismo operón<sup>40</sup> dado que realizan funciones enzimáticas opuestas. Además de *pdeA* y *dgc*, el operón *cdg1* contiene al gen *cdg1a* que codifica un presunto activador transcripcional regulado por  $O_2$  y al gen *cdg1d* que codifica una proteína de función desconocida. La interrupción de los genes *dgc* reduce la producción *in vivo*, demostrando la importancia del activador. El papel de la diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa A en la velocidad de síntesis del cofactor se describe a continuación.

### Regulación del proceso de síntesis

El mecanismo que regula la velocidad de síntesis de *G. xylinum* es muy particular, ya que un nucleótido cíclico novedoso es el regulador alostérico<sup>41</sup> de la enzima CS. La presencia de c-di-GMP en un sistema *in vitro* es capaz de acelerar la velocidad de síntesis en un factor de hasta 200 veces y su inactivación *in vivo* disminuye considerablemente la polimerización del glucano.

La concentración neta de c-di-GMP está controlada por su

síntesis y degradación. La diguanilato ciclasa sintetiza c-di-GMP a partir de dos moléculas de guanosina trifosfato (GTP); el proceso de degradación requiere de dos enzimas: la fosfodiesterasa A que cataliza la ruptura del anillo de c-di-GMP rindiendo una molécula lineal y la fosfodiesterasa B, que cataliza la escisión del dinucleótido lineal a dos moléculas de 5' guanosina monofosfato.

En este proceso, el  $O_2$  muestra un papel regulatorio sobre la síntesis de CB, ya que tanto la diguanilato ciclasa como la fosfodiesterasa A contienen dominios sensores de  $O_2$ . La fosfodiesterasa A contiene en su extremo N-terminal un dominio PAS con un grupo hemo y en el extremo C-terminal el dominio de fosfodiesterasa. Los dominios PAS están ampliamente distribuidos y participan en la transducción de señales. Dentro de las señales que detecta un dominio PAS se encuentran: oxígeno, luz, potencial redox, etc. El dominio PAS de la fosfodiesterasa A es homólogo al presente en proteínas sensoras de oxígeno como FixL. El grupo hemo de PDEA puede estar en dos formas: oxihemo o deoxihemo dependiendo de la presencia o ausencia de  $O_2$ <sup>42</sup> asociado.

En presencia de  $O_2$ , la forma oxihemo disminuye la actividad de fosfodiesterasa y en consecuencia aumenta la concentración neta de c-di-GMP mientras que en ausencia de  $O_2$ , la forma deoxihemo activa a la enzima y en consecuencia aumenta la degradación del activador, disminuyendo así, la tasa de síntesis. Este sistema regulatorio conecta la síntesis de CB con el estado energético, dependiente de la fosforilación oxidativa, manteniendo la velocidad del proceso de polimerización acorde con el metabolismo celular, mediante un mecanismo en el cual la actividad de la diguanilato ciclasa está ligada a otros procesos dependientes de GTP como la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos. Por otra parte, el  $O_2$  es indispensable para la fosforilación oxidativa, necesaria para la síntesis del ATP requerido en la síntesis de CB. A la fecha poco se ha estudiado sobre la bioenergética de la bacteria, aunque se ha planteado la caracterización de la cadena de transporte de electrones y su asociación con la biosíntesis de CB.

### MECANISMO DE SÍNTESIS Y EXTRUSIÓN DE CB

#### Catálisis en la celulosa sintasa

El mecanismo de acción de la CS está lleno de especulaciones y contradicciones, diversas hipótesis se han formulado sobre los datos recabados. En un principio se asumía que la cadena de CB se sintetizaba a partir del extremo reductor de la D-glucosa pero actualmente se piensa que procede por el extremo no reductor<sup>31</sup>. También se afirma que el precursor UDP-glucosa se transfiere mediante la participación de lípidos de la membrana plasmática<sup>30</sup>, aunque se piensa sea más factible por su disponibilidad, la transferencia directa desde el citoplasma. Por último, la más reciente controversia en la CS y en otras  $\beta$ -glicosil transferasas aditivas radica en la hipótesis que asume la presencia de dos centros catalíticos en la enzima<sup>43</sup>.

La CB es un polímero de glucosa cuyos residuos adyacentes están rotados  $180^\circ$  uno con respecto al otro; esta alteración de orientación en los monómeros provoca un problema de torsión en la catálisis. Para resolver el problema de torsión, Saxena<sup>43,44</sup> plantea el modelo de “dos centros catalíticos” que funciona para otras  $\beta$ -glicosil transferasas aditivas (como en las sintasas de quitina y hialurona).

El modelo de dos centros catalíticos se basa en un análisis de grupos hidrofóbicos, el cual identificó dos dominios en la CS: un dominio con tres residuos de aspartato característicos de  $\beta$ -glicosil transferasas aditivas y un segundo dominio con un residuo de aspartato seguido del dominio catalítico QXXRW. La arquitectura de doble dominio hace factible el modelo en el cual, dos centros catalíticos funcionan para adicionar dos moléculas de UDP-glucosa por reacción, cada centro se orienta  $180^\circ$  uno con respecto al otro permitiendo la síntesis del polímero sin el problema de torsión. Si bien el modelo es viable y parece resolver el mecanismo catalítico, la vía de extrusión del polímero sigue siendo un misterio.

#### Modelos de síntesis y extrusión

Para abordar la forma en que la CB es sintetizada y posteriormente extruída se debe considerar que la CS es una enzima integral de membrana y en consecuencia la síntesis está asociada a la membrana plasmática. El polímero debe atravesar la membrana plasmática y emerger en el espacio extracelular donde mediante puentes de hidrógeno, se asocia a otras cadenas del polímero formando arreglos cristalinos. Tomando en cuenta las tres etapas (polimerización, extrusión y cristalización), varios modelos hipotéticos son generados para explicar el complejo proceso en la biogénesis de CB<sup>31</sup>.

**Modelo I.** Sitio catalítico de la CS orientado al citoplasma. Se basa en la predicción de los segmentos transmembrana y en la disponibilidad del sustrato, se propone que si la polimerización ocurre en el citoplasma, entonces: a) la catálisis ocurre en el citoplasma, b) la polimerización tiene lugar allí, y c) la extrusión requiere de una estructura de “poro” proporcionado por la CS o por otras proteínas asociadas a ella (Figura 4a).

**Modelo II.** Sitio catalítico de la CS orientado al espacio extracelular.

Este modelo permite obviar el proceso de extrusión; aunque los datos existentes no lo avalan, su principal obstáculo es la disponibilidad del sustrato. Así, a) el sitio catalítico se ubica en el espacio extracelular, b) la polimerización se lleva a cabo en el espacio extracelular, y c) no se requiere proceso de extrusión (Figura 4b).

**Modelo III.** Catálisis asociada a intermediarios lipídicos. El modelo propone la unión de UDP-glucosa a un

intermediario lipídico para su entrega a la CS. Aunque el modelo expone la llegada del sustrato a la CS, la extrusión del polímero requiere de una explicación. a) El sitio catalítico se ubica en el citoplasma, b) la polimerización toma lugar en el citoplasma asociado a un intermediario lipídico, y c) se requiere de un proceso de extrusión (Figura 4c).

**Modelo IV.** Asociación de glicosil-transferasas.

Es el modelo más complejo, implica dos  $\beta$ -glicosil transferasas, una en el lado citoplásmico (no aditiva) y otra extracelular (aditiva). El modelo indica que la glucosa primero se adiciona a un compuesto lipídico (lipidil-UDP-Glucosa) del lado citoplásmico de la membrana celular, el intermediario lipídico se mueve al lado extracelular de la membrana celular, en donde una transferasa aditiva cataliza la polimerización, de esta manera, a) dos sitios catalíticos son requeridos, uno ubicado en el lado citoplásmico y el otro extracelular, b) la polimerización toma

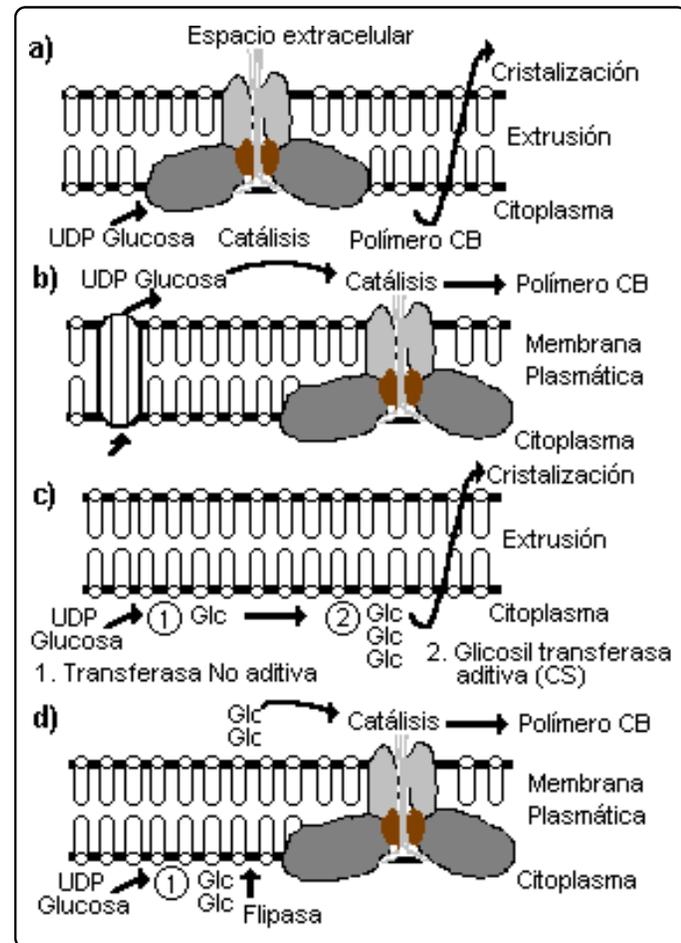


Figura 4. Modelos de los mecanismos de síntesis y extrusión de CB en *G. xylinum*. a) Sitio catalítico de la CS orientado al citoplasma, b) Sitio catalítico de la CS orientado al espacio extracelular, c) Catálisis asociada a intermediarios lipídicos, d) Asociación de glicosil-transferasas.

lugar en el espacio extracelular, y c) no se requiere de extrusión (Figura 4d).

Estos modelos pretenden explicar la síntesis y extrusión del polisacárido y también se postulan para otras  $\beta$ -glicosil transferasas, la clave en la resolución del modelo más adecuado para este proceso provendrá de los datos obtenidos del estudio cristalográfico de la CS. Después de analizar los avances obtenidos por varias décadas en *G. xylinum*, muchos de ellos extrapolados a plantas superiores, revisaremos las aplicaciones potenciales actuales y futuras de la CB.

### PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS DE LA CB

Debido a su alta pureza e inusuales propiedades fisicoquímicas la CB ofrece una amplia variedad de aplicaciones potenciales (Cuadro II)<sup>20</sup>. En los pasados 10 años, al menos cincuenta patentes referentes a sistemas de producción y aplicaciones de la CB han sido generadas.

Una membrana de CB posee alta capacidad sónica (propiedades comparables a una película de aluminio o titanio), esta propiedad fue utilizada por Sony Corp. y Ajinomoto (Japón) creando diafragmas de alta fidelidad acústica (US PATENT 4,724,164). En la década de los ochentas, Johnson & Johnson inició el empleo de la CB como un apósito saturado de líquido cuya finalidad era el cuidado de la piel (US PATENT 4,655,758), aprovechando la alta capacidad absorbente del material.

De la misma manera el uso de CB fibrosa para la fabricación de papel con mayor durabilidad y flexibilidad está en preparación por la compañía Mitsubishi Paper Mills Co. en consorcio con Ajinomoto Co (JPPATENT 63,295,793), las características de este papel son ideales en su uso como papel moneda o materia prima en la elaboración de libros<sup>10</sup>.

La más reciente utilidad de la CB se ha dado en el área de la medicina. La alta fuerza mecánica de la película de CB en estado hidratado, su permeabilidad a líquidos y gases y la poca irritación dérmica que provoca su contacto, la postulan como un sustituto de piel en la terapia de quemaduras. Biofill® y Gengiflex® son productos de CB con amplia utilidad en cirugía e implantes dentales.

Biofill® es utilizado en casos de quemaduras de segundo y tercer grado así como en úlceras<sup>45</sup>; su eficacia ha sido probada en más de 300 casos, Biofill® permite el uso de antibióticos disminuyendo el riesgo de infección; la alta absorción evita la deshidratación del paciente, principal riesgo en quemaduras. Su única y principal desventaja es la elasticidad limitada en áreas corporales de gran movilidad. Gengiflex® fue desarrollado para tejidos periodontales en recuperación.

Industria	Aplicaciones
Cosmética	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas. Generación de uñas artificiales.
Textil	Material de alta absorción acuosa.
Refinería	Material para absorción de toxinas y aceites.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad.
Alimentos	Aditivo de alimentos, emulsificante, fibra dietética.
Maquiladora	Componente de partes y refacciones.
Turística	Ropa deportiva y equipo de acampar.
Investigación	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía.
Tecnología	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos.
Medicina	Fabricación de "piel artificial" en terapia de quemaduras. Componente en implantes dentales.

Cuadro II. Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano. Adaptado de Krystynowicz and Bielecki, 2002<sup>20</sup>.

Un grupo alemán ha generado BASYC® (por sus siglas Bacterial Synthesized Cellulose), que es un biomaterial con diseño tubular destinado a aplicaciones en microcirugía de arterias y venas<sup>46</sup>. La medicina veterinaria también ha aprovechado las ventajas de la CB y Cellumed® se ha desarrollado para la terapia en úlceras en caballos<sup>47</sup>.

### CONCLUSIONES

Las propiedades emulsificantes, cohesivas y de absorción, además de no provocar reacción alérgica en la aplicación dérmica o en la elaboración de alimentos, le auguran a la celulosa bacteriana un futuro promisorio en aplicaciones en la industria alimentaria y de cosméticos. Muchos de sus usos se obstaculizan por la disponibilidad y costo del polímero; el punto crítico para la explotación de este recurso estriba en incrementar los niveles de producción y abatir los costos. La generación de un sistema productivo eficiente será la base para empezar a explotar las cualidades de este recurso natural renovable.

### REFERENCIAS

- Kobayashi, S., Kashiwa, K. & Shoda, S. Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first *in vitro* synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1677- 1678 (1991).
- Lee, J., Brown, R., Kuga, S., Shoda, S. & Kobayashi, S. Assembly of synthetic cellulose I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7425-7429 (1994).
- Nakatsubo, F., Kamitakahara, H. & Hori, M. Cationic ring opening polymerization of 3,6 D O-benzyl- $\alpha$ -D-Glucose 1,2,4-orthopivalate and the first chemical synthesis of cellulose. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1677-1678 (1996)
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N. & Iguchi, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mater. Sci.* **24**, 3141-3145 (1989).
- Yamada, Y., Hoshino, K. & Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria

- based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1244-1251 (1997).
6. Williams, S. & Cannon, R. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2448-2452 (1989).
  7. Budhiono, A., Rosidi, B. & Iguchi, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in *nata de coco* culture system. *Carbohydr. Polym.* **40**: 137-143 (1999).
  8. Mormino, R. & Bungay, H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 503-506 (2003).
  9. Cheng, H., Wang, P., Chen, J. & Wu, W. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**: 125-132 (2002).
  10. Iguchi, M., Yamanaka, S. & Budhiono, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* **35**, 261-270 (2000).
  11. Heo, M. & Son, H. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**: 41-45 (2002).
  12. Ramana, K., Tomar, A. & Singh, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 245-248 (2000).
  13. Pérez, S. & Mackie, B. Structure and Morphology of cellulose. Consultado en [www.cermav.cnrs.fr/cours/smc\\_anglais/contenu/Chap\\_4/4.html](http://www.cermav.cnrs.fr/cours/smc_anglais/contenu/Chap_4/4.html), 8 Enero de 2003.
  14. Fengel, D. & Wood, G. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. (Fengel and Wegener Eds.) Walter de Gruyter, New York, USA 66-105 (1989).
  15. Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. & Yoshinaga F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**, 187-200 (1998).
  16. Yamanaka, S. & Ishihara, M. & Sugiyama, J. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* **7**, 213-225 (2000).
  17. Jonas, R. & Farah, L. Production and application of microbial cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, 101-106 (1998).
  18. Vandamme, E., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. & De Wulf, P. Improved Production of Bacterial Cellulose and its Application Potential. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, 93-99 (1998).
  19. Klemm, D., Schmauder, H. & Heinz, T. Bacterial cellulose in Biopolymers Vol. 5 Polysaccharides from prokaryotes (Alexander Steinbüchel Ed.) Wiley (2002).
  20. Krystynowicz, A. & Bielecki, S. Biosynthesis of bacterial cellulose and its potential application in the different industries. *Polish Biotechnology News* Consultado en [www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html](http://www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html).
  21. Hestrin, S. & Schramm, M. Synthesis of cellulose by *A. xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* **58**, 345 (1954).
  22. Colvin, J. & Leppard, G. The Biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 701-709 (1977).
  23. Glaser, L. The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*. *J. Biol. Chem.* **232**, 627-636 (1958).
  24. Brown, R., Willison, J. & Richardson, C. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: 1. Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 4565-4569 (1976).
  25. Kimura S., Chen, H., Saxena, I. & Brown, M. Localization of c-di-GMP binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **183**, 5668-5674 (2001).
  26. Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58 (1991).
  27. Weinhouse, H. & Benziman, M. Regulation of hexose phosphate metabolism in *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **138**, 537-542 (1974).
  28. Swissa, M. et al. Intermediary steps in cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. *J. Bacteriol.* **143**, 1142-1150 (1980).
  29. Matthyse, A., Thomas, D. & White, A. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177**, 1076-1081 (1995).
  30. Hans, N. & Robyt, J. The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. *Carbohydr. Res.* **313**, 125-133 (1998).
  31. Brown, R. & Saxena, I. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 57-67 (2000).
  32. Benziman, M. & Mazover, A. NAD and NAD phosphate specific glucose-6-phosphate dehydrogenases of *Acetobacter xylinum* and their role in the regulation of the pentose cycle. *J. Biochem. Chem.* **248**, 1603-1608 (1973).
  33. Wong, H. et al. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8130-8134 (1990).
  34. Saxena, I., Kudlika, K., Okuda, K. & Brown, M. Characterization of genes in the cellulose synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* **176**, 5735-5752 (1994).
  35. Romling, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* **153**, 205-212 (2002).
  36. Saxena, I. & Brown, M. Identification of a second cellulose synthase gene (acsII) in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **177**, 5276-5283 (1995).
  37. Méndez-Ortiz, M. & Membrillo-Hernández, J. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **7(1)**, 26-34 In press (2004).
  38. Delmer, P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245-276 (1999).
  39. Weinhouse, H., Shapir, S. & Benziman, M. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *A. xylinum*. *FEBS Lett.* **416**, 207-211 (1997).
  40. Tal, R. et al. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416-4425 (1998).
  41. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikan, D. & Benziman, M. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18933-18943 (1990).
  42. Gilles-González, M. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* **51**, 165-173 (2001).
  43. Saxena, I., Brown, M., Fevre, M., Geremia, A. & Henrissat, B. Multidomain architecture of  $\beta$  glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J. Bacteriol.* **177**, 1419-1424 (1995).
  44. Brown, R., Saxena, I. & Kudlika, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant. Sci.* **1**, 149-156 (1996).
  45. Fontana, J., De Souza, A. & Torriani, L. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 253-264 (1990).
  46. Klemm, D., Schumann, D. & Marsch, S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561-1603 (2001).
  47. Schmauder, H., Frankenfeldt, K. & Lindner, B. Bakterienzellulose-ein interessantes biomaterial. *Bioforum 2000* **23**, 484-486 (2000).