



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

VICTOR HUGO ALVES GONZAGA DE OLIVEIRA

Produção de celulose bacteriana

Araraquara, SP

2022

VICTOR HUGO ALVES GONZAGA DE OLIVEIRA

Produção de celulose através da bactéria *Komagataeibacter xylinus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Álvaro de Baptista Neto

**Araraquara, SP
2022**

Dedicatória e Agradecimento

Dedico este trabalho primeiramente a minha família, Luiz Gonzaga, Meire e Luiz Eduardo, que sempre me proporcionou oportunidades de estudo e aprendizado. Também não posso deixar de agradecer pessoas queridas que sempre estiveram por mim assim como eu por eles, Lucas Kubo, Pedro Costa, Victor Sanches, Júlia Amaral, Nicolas Marsiglia, Laura Tobias, Gabriel do Prado, Matheus Pelissari, Vinicius Gonçalves e Thainá Oliveira.

Além destes, quero agradecer como gestões no geral, as que tive o prazer de participar, de entidades como CAOS (Centro Acadêmico Osamu Shimomura), CACIF (Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas), All Pharma Jr. (atualmente Catálise Jr.), BACTERIA e Bateria Fúria Capilar.

Por fim, agradeço imensamente ao meu orientador e professor Dr. Álvaro de Baptista Neto, que além de realizar toda a orientação de maneira leve, cadenciada e profissional para a execução desta revisão, foi de grande importância durante todo meu período na graduação, assim como sei que foi também para vários outros alunos do curso de EBB. Álvaro sempre se demonstrou muito atento e cuidadoso para com o corpo discente, colaborando muito para a fluidez do curso.

RESUMO

A busca pela produção sustentável de polímeros tornou-se uma das principais vertentes das indústrias hoje. Temas como “preservação do meio ambiente” e “escassez de recursos naturais” dominam os cenários industriais. A celulose é um polímero produzido em grande escala por muitas indústrias, tendo vasta gama de aplicação, mas ainda é obtida, recorrentemente, por métodos não amigáveis com o meio ambiente. Para solucionar tal problema em relação ao meio ambiente, a produção de celulose pode ser realizada através de vias metabólicas de algumas bactérias, que, além de ser um processo com viés mais natural em relação à produção restrita às vias químicas, é um produto de maior qualidade. A oportunidade de poder realizar a produção de celulose bacteriana por diferentes substratos envolve a possibilidade de realizar a mesma utilizando fontes tais como resíduos industriais, o que acarreta na diminuição do custo de produção e agrega mais valor ao produto final. A pesquisa em questão irá realizar uma busca de literatura visando avaliar o meio de cultivo de celulose bacteriana por *komagataeibacter xylinus* entre três diferentes substratos residuais de indústrias (glicerol, vinhaça e soro de leite) a fim de otimizar a produção da celulose e diminuir os impactos causados pela síntese química da mesma.

Palavras-chave: celulose bacteriana; *komagataeibacter xylinus*; glicerol; vinhaça; soro de leite.

Abstract

The quest for sustainable polymer production has become a major focus for industries today. Themes such as "environmental preservation" and "scarcity of natural resources" dominate the industrial scenarios. Cellulose is a polymer produced on a large scale by many industries, has a wide range of applications, but is still recurrently obtained by environmentally unfriendly methods. To solve this problem in relation to the environment, the production of cellulose can be performed through metabolic pathways of some bacteria, which, besides being a process with a more natural bias in relation to the production restricted to chemical pathways, is a higher quality product. The opportunity to perform the production of bacterial cellulose by different substrates involves the possibility of performing the same using sources such as industrial waste, which results in the reduction of production cost and turns the product itself into more valuable. The research in question will analyze the best production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* using different concentrations of three different residual substrates from industries (glycerol, vinasse, and whey) in order to optimize the production of cellulose and reduce the impacts caused by its chemical synthesis.

Keywords: bacterial cellulose; *Komagataeibacter xylinus*; glycerol; vinasse; whey.

Lista de Figuras e Ilustrações

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura da celulose destacando a celobiose..... | 13 |
| Figura 2 – Representação das ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares das cadeias de celulose..... | 14 |
| Figura 3 – Ilustração esquemática da via metabólica da síntese de celulose bacteriana através microrganismos..... | 20 |
| Figura 4 - Microscopia da formação da celulose bacteriana a) <i>Komagataeibacter xylinus</i> no momento em que excreta fibrilas elementares; b) rede tridimensional que a bactéria produz..... | 21 |
| Figura 5 – Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por <i>K. xylinus</i> – Glicoquinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato diquinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforribulose epimeraase (14); Fosforribulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19)..... | 22 |
| Figura 6 – Fermentação em cultivo a) estático e b) agitado de <i>Komagataeibacter xylinus</i> K975 que produz celulose bacteriana..... | 26 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Características da celulose bacteriana <i>versus</i> celulose vegetal..... | 15 |
|---|----|

Lista de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Evidências de aplicações de celulose bacteriana (CB) segmentadas por diferentes áreas industriais..... | 17 |
| Quadro 2 – Métodos para a produção de celulose bacteriana (CB)..... | 27 |

Sumário

| | |
|--|----|
| Dedicatória e Agradecimento | 3 |
| RESUMO | 4 |
| Palavras-chave: celulose bacteriana; <i>komagataeibacter xylinus</i> ; glicerol; vinhaça; soro de leite. | 4 |
| Abstract | 5 |
| Lista de Figuras e Ilustrações | 6 |
| Lista de Tabelas | 7 |
| Sumário | 8 |
| 1 Introdução | 9 |
| 2 Objetivos | 11 |
| 3 Metodologia | 11 |
| 4 Referencial Teórico | 11 |
| 6 Conclusão | 32 |
| 7 Referências | 33 |

1 Introdução

A busca pela produção sustentável de polímeros tornou-se uma das principais vertentes das indústrias hoje. Temas como “preservação do meio ambiente” e “escassez de recursos naturais” dominam os cenários industriais. A celulose é um polímero produzido em grande escala por muitas indústrias, tem vasta gama de aplicação, mas ainda é obtida, recorrentemente, por métodos não amigáveis com o meio ambiente. (BOLDRIN, 2015)

O termo “celulose” foi originalmente denominado pelo pesquisador Alsem Payen no século passado, dado à substância que compõe a parede celular de plantas superiores. Tempos depois, Luis Pasteur descreveu a celulose bacteriana (CB) como um produto extra celular das bactérias do vinagre, sendo esta com características escorregadias, de pele úmida, inchada e gelatinosa. Uma das cepas pioneiras, determinada e utilizada, por Brown, em 1886, para produção de celulose bacteriana foi a de *Acetobacter xylinum*, primeiramente encontrada em forma de película sob a superfície de uma solução de cerveja.

O motivo pelo qual algumas bactérias produzem celulose é variado entre autores do mundo todo, porém, todos concordam no ponto de que é uma membrana protetora criada pelo microrganismo para conseguir se isolar do meio externo. Apesar de várias delas serem aeróbias restritas, a membrana auxilia contra oxidação excessiva, contra raios ultravioleta e é hidrofílica, para que haja difusão de nutrientes fundamentais no desenvolvimento do organismo. (IGUCHI *et al.*, 2000)

Para solucionar o problema em relação ao meio ambiente, a produção de celulose pode ser realizada através de vias metabólicas de algumas bactérias, que, além de ser um processo com viés mais natural em relação à produção restrita às vias químicas, é um produto de maior qualidade, em termos de grau de pureza e de resistência do material em si. As cepas mais utilizadas hoje nas indústrias para produção de celulose bacteriana são as que se relacionam taxonomicamente com os gêneros *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*. Dentre estas, a cepa mais utilizada é a *Komagataeibacter xylinus*, esta tem forma bacilar, é gram-negativa e aeróbia estrita. São encontradas em diversas formas, desde sozinhas ou em pares, até em cadeias e pequenos aglomerados. Se tratam de membranas com

propriedades nanométricas, mais resistentes à impactos mecânicos, com maiores níveis de hidrofobicidade, maiores índices de pureza, de cristalinidade, maior adaptabilidade biológica, entre outros fatores. (KLEMM *et al.*, 2001; DONINI *et al.*, 2010)

As bactérias deste gênero são as mais utilizadas por um motivo, conseguem produzir celulose a partir de diversas fontes de carbono distintas, não se restringindo somente à glicose. Tal fator é fundamental e sustenta a quantidade de trabalhos científicos aplicados nos últimos anos. Devido a isto, a oportunidade de poder realizar a produção de celulose bacteriana por diferentes substratos envolve a possibilidade de realizar a mesma utilizando fontes tais como resíduos industriais, o que acarreta na diminuição do custo de produção e agrega mais valor ao produto final. (ROSS *et al.*, 1991)

A celulose bacteriana apresenta algumas vantagens quando comparada à celulose vegetal, assim a necessidade em produzi-la não se limita apenas as questões ambientais. A CB não é associada a outros polímeros, como hemicelulose e lignina, fator que permite menores custos de produção, menor tempo de processamento e aumenta as aplicações industriais. Também, como não depende de longos e extensivos cultivos agroflorestais, sua síntese ocorre em menor tempo. Algumas outras propriedades conferem vantagem à CB, ela demonstra propriedades físicas excelentes em termos de resistência à tração, estabilidade mecânica, biocompatibilidade, pureza, termoestabilidade e cristalinidade. (BARUD *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2016).

Dessa forma, reconhecendo-se a produção de celulose através de vias metabólicas da bactéria *Komagataeibacter xylinus* como uma alternativa que traz um produto de maior qualidade, assim como vantagens para o meio ambiente, esta pesquisa justifica-se através de seus objetivos, os quais visam analisar diferentes composições dos meios de cultivo para a melhor produção de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus*. Também, variar as concentrações dos substratos frutose, sacarose, extrato de malte, açúcares invertidos e conferir qual composição reflete no melhor rendimento da produção de celulose bacteriana, a fim de otimizar a produção da celulose e diminuir os impactos causados pela síntese química da mesma.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar os trabalhos em literatura, visando identificar os melhores meios de cultivo para a produção de celulose, através da bactéria *Komagataeibacter xylinus*, visando uma maior produtividade da mesma.

3 Metodologia

Para a realização do deste trabalho revisou-se trabalhos, periódicos e materiais científicos publicados, que contemplam a temática de produção de celulose bacteriana, utilizando o microrganismo *Komagataeibacter xylinus*, a fim de analisar sob qual condição de cultivo apresenta-se a melhor para a produção da celulose.

Para cada um dos substratos, averiguou-se diferentes estudos, com variações de meios e concentrações, comparando com o meio padrão HS (Hestrin-Schramm) , encontradas na literatura. Também se investigou os meios de cultivos e as suas composições. Avaliou-se tanto a produção em meio estático, quanto em meio agitado, também comparando diferentes velocidades de agitação do meio reacional.

Por final, levantou-se os métodos analíticos mais utilizados hoje, para determinação da concentração de substratos após produção da celulose, assim como para quantificação da celulose produzida, propriamente dita, após passar por processos de purificação e secagem.

4 Referencial Teórico

4.1 Celulose

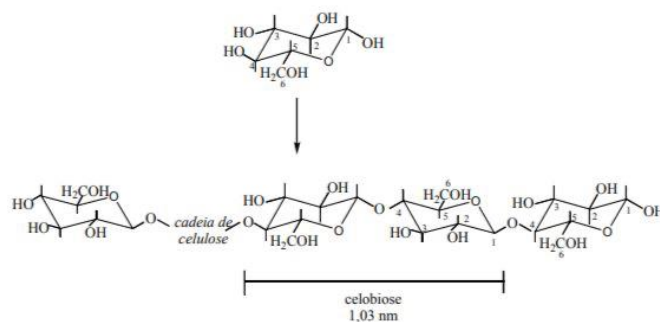
A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um biopolímero renovável e biodegradável, é o principal componente da parede celular de plantas, sendo assim, é o polímero natural mais abundante e onipresente no mundo. Logo, este polímero, que tem sua maior parte de produção com origem vegetal, é o mais utilizado atualmente. (LAMPUGNANI *et al.*, 2019). No entanto, sabe-se que existem outras fontes de celulose, não vegetais, que englobam bactérias e tunicados, produzidos por criaturas marinhas. (EICHHORN *et al.*, 2010; ABDUL; BHAT; IREANA, 2012). Estima-se que 10^{12} toneladas por ano,

deste polímero, sejam obtidas para aplicações industriais, sendo que as indústrias de papel, têxteis e químicas detêm 60 % desta produção anual. (GUPTA *et al.*, 2019).

O Brasil, em 2015, liderava o ranking mundial de exportação de celulose, com mais de 10,6 milhões de toneladas (GEDF – CD/FIEP-2016). Além disso, foi considerado o país importador com o menor preço cobrado por toneladas, devido a diferentes fatores, como solos férteis que facilitam a produção deste polímero, clima favorável e a utilização de biotecnologia e de engenharia genética pelas empresas brasileiras. (DEPEC/BRADESCO, 2016).

Classificada como um carboidrato, homopolissacarídeo, monômeros de mesma espécie compondo a molécula final, formado por unidades repetitivas de celobiose, unidade de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β 1 \rightarrow 4, a celulose (Figura 1) é única que pode ser sintetizada a partir de, ou hidrolisada em monossacarídeos (ALTANER *et al.*, 2014)

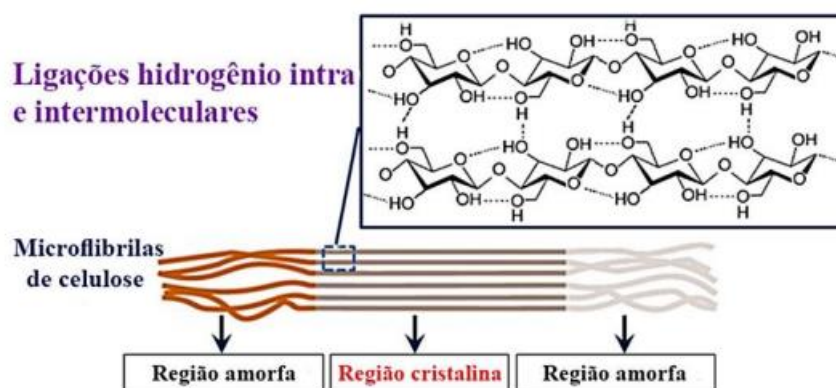
Figura 1 – Estrutura da celulose destacando a celobiose.



Fonte: Moreira, 2009.

Esse polímero é formado por dois tipos de interação, intramoleculares e intermoleculares, ambas, responsáveis pela formação das cadeias deste polímero, são do tipo ligações de hidrogênio. Enquanto as ligações intramoleculares acontecem entre grupos hidroxila da mesma molécula, por sua vez, as intermoleculares prevalecem entre grupos hidroxila de cadeia adjacentes (Figura 2). Tais ligações de hidrogênio da celulose são responsáveis pela solubilidade e pelas propriedades mecânicas da mesma. (ALTANER *et al.*, 2014).

Figura 2 – Representação das ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares das cadeias de celulose.



Fonte: WU *et al.*, 2012.

A celulose, na sua forma nativa, é chamada de celulose-I, sendo classificada por seus alomorfes de duas maneiras: tipo Ia e tipo Ib. Elas se diferenciam entre si, uma delas por ser um sistema cristalográfico triclinico, o qual apresenta cristais de simetria mais pobre, composto por três eixos cristalográficos diferentes entre si. Tal fator também prevalece para com os ângulos entre eles. A outra é um sistema cristalográfico monoclinico com três eixos cristalográficos que têm comprimentos diferentes entre si. Seus ângulos α e γ têm 90° e o ângulo β tem valor diferente de 90° . Ambos foram determinados com grande precisão e têm um complexo sistema de ligação de hidrogênio, característica da estabilidade desse polímero que possui baixa solubilidade em soluções aquosas e não tem ponto de fusão. (EICHHORN *et al.*, 2010; ABDUL; BHAT; IREANA, 2012). Ademais, existe a celulose tipo II, a qual é obtida a partir da celulose tipo I por duas rotas: recristalização ou mercerização (tratamento com NaOH em estado sólido). A principal diferença estrutural entre a celulose tipo I e tipo II é que a tipo I possui um arranjo paralelo, ao contrário da tipo II, que possui

arranjo antiparalelo. Tais arranjos são predominantes em outros tipos de celulose que seguem essas classificações. (CHAWLA *et al.*, 2009; KLEMM, D. *et al.*, 2005; PEREZ and SAMAIN, 2010).

4.2 Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (CB) foi inicialmente relatada por Brown em 1886. O pesquisador observou a formação de uma película gelatinosa na superfície do caldo de fermentação do vinagre, assim, identificou uma estrutura semelhante à da celulose vegetal, também, por análise microscópica, foi evidenciada a presença de bactérias produtoras, como *Acetobacter xylinum* (SILVA, 2019).

Diante da busca por alternativas mais sustentáveis e que possam ampliar a produção, a celulose bacteriana aparece como uma alternativa promissora. Suas vantagens são evidenciadas desde a forma de obtenção, pois a produção ocorre independentemente de condições climáticas, sendo possível utilizar matérias-primas regionais, assim há maior agilidade para a obtenção do produto final e tem infraestrutura de custo relativamente mais baixa. Também, além do seu benefício em relação à sustentabilidade, a CB possibilita uma escala produtiva maior, por apresentar excelentes propriedades físicas em relação à estabilidade mecânica, cristalinidade, grau de pureza, biocompatibilidade e resistência à tração. (BARUD *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2016)

As celulosas bacterianas e vegetais possuem a mesma fórmula química entre si, mas, as fibras (em dimensões nanométricas) da CB fornecem a ela propriedades como maior resistência mecânica à tração, possibilitando a inserções *in-situ* durante o cultivo de bactérias *Gluconacetobacter xylinus*. Dentre algumas aplicações industriais, estão regeneração tecidual, composição de biomateriais, órgãos para implantes vasculares, entre outras. (DONINI *et al.*, 2010)

De maneira mais ilustrativa, a celulose bacteriana destaca-se em relação às suas propriedades físico-químicas, como mostra a Tabela 1. A CB consiste em microfibrilas, que são, aproximadamente, 100 vezes menores que as fibrilas de celulose vegetal e não possuem impurezas, como lignina e hemicelulose,

proporcionando espaços vazios entre as fibras e, conseqüentemente, área de superfície expandida e matriz altamente porosa. Quanto às suas propriedades, incluem-se alta resistência à tração, cristalinidade (80-90% maior do que a celulose vegetal), capacidade de retenção de água, grau de polimerização, maleabilidade em estruturas tridimensionais e biocompatibilidade. (KADIER, ILYAS, HUZAIFAH, *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Características da celulose bacteriana *versus* celulose vegetal.

| Propriedade | Celulose Vegetal | Celulose Bacteriana |
|----------------------------|------------------|---------------------|
| Largura da fibra (nm) | 14 - 40.000 | 50 - 80 |
| Cristalinidade (%) | 43 - 65 | 84 - 89 |
| Grau de polimerização | 13.000 - 14.000 | 2.000 - 6.000 |
| Módulo de Young (GPa) | 13 - 180 | 15 - 138 |
| Resistência à tração (MPa) | 10 - 250 | 91 - 260 |
| Quantidade de água (%) | 60 | 98,5 |

Fonte(s): Campano *et al.*, 2016; Chawla *et al.*, 2009; Dufresne *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2011; Pecoraro *et al.*, 2008.

A sua aplicabilidade está diretamente relacionada às suas propriedades macrofísicas, térmicas e mecânicas. Suas propriedades mecânicas (resistência à tração, alta flexibilidade e cristalinidade) são de interesse para tratamento de perfuração de membrana timpânica, filme de proteção, alimentos filmes de embalagem, diafragmas de alto-falantes de áudio, entre outros diversos setores. Sua estrutura nanométrica possibilita seu uso como aglutinante, já a sua biocompatibilidade é o maior interesse da biomedicina. Logo, a prestabilidade de um material é um fator importante para promover a pesquisa e o investimento no mesmo. Como mostra a Tabela 2, reforça-se que, por conta de suas propriedades, a celulose bacteriana é um material com grande potencial de aplicação entre diversas áreas como de alimentos, engenharia de tecidos, têxtil, farmacêutica, de saúde e cosméticos, até na área eletrônica. (WANG; CHEN, 2011; MOHITE; PATIL, 2014; RAJWADE *et al.*, 2015).

Quadro 1 – Evidências de aplicações de celulose bacteriana (CB) segmentadas por diferentes áreas industriais.

| ÁREA | APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA |
|--------------------------------|---|
| Cosméticos | Estabilizador de emulsões |
| Indústria têxtil | Roupas para esportes, tendas e equipamentos para acampamento |
| Mineração e refinaria | Esponjas para coleta de vazamento de óleo, material para absorção de toxinas |
| Tratamento de lixo | Reciclagem de minerais e óleos |
| Purificação de esgotos | Ultrafiltração de água para descontaminação |
| Equipamentos eletroeletrônicos | Diafragmas para microfones e estereofones Materiais optrônicos (telas de cristal líquido, suporte para OLED, equipamentos para controle luminoso) |
| Energia | Membrana sintetizada a partir de paládio como catalisador, para formar unidades internas (células) de baterias |
| Indústria de papel | Para obtenção de papéis especiais, em substituição à celulose de madeira |
| Indústria de alimentos | Celulose comestível (“nata de coco”) Filme para cobertura de alimentos, reduzindo a velocidade de amadurecimento e a possibilidade de crescimento de micro-organismos contaminantes Ação como crioprotetor para preservação de micro-organismos probióticos em alimentos |
| Saúde | Engenharia de tecidos – regeneração de órgão e tecido a partir de recrutamento do próprio paciente, em suporte plimérico de celulose, como regeneração de pele em feridas derivadas de perda tissular por queimaduras ou úlceras Constituição de próteses como implantes dentários Liberação controlada de antibióticos em sítio tissular |
| Laboratório | Imobilização de proteínas e de células, constituição de suporte para cromatografia, meios para cultura de tecidos |

Fonte(s): Adaptado de COIMBRA, 2015.

4.2.1 Bactérias

A produção de CB por intermédio das bactérias ocorre como processo do metabolismo destas, além de que, hoje é sugerido que a membrana produzida entre a interface ar-líquido possibilita que as bactérias aeróbias migrem para a superfície, acarretando na obtenção de oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Tanto quando estas estão em solução líquida e cultivadas por agitação, quanto quando estão crescendo estaticamente. Também, sabe-se que além do meio, os substratos podem ser alterados, porém, alterando a produção (KADIER, ILYAS, HUZAIFAH, *et al.*, 2021).

As Bactérias do Ácido Acético (BAA) são classificadas como uma família de bactérias gram-negativas, estritamente aeróbias e possuem forma de bastonete.

Estas, da família *Acetobacteraceae*, são reconhecidas pela característica de serem bactérias de grau alimentício ou GRAS (geralmente reconhecida como segura), o que é importante para a produção de celulose (SINGH, WALKER, LEDESMA-AMARO, ELLIS, 2020).

Entre as bactérias que podem sintetizar a celulose bacteriana estão as dos gêneros *Agrobacterium spp.*, *Acetobacter spp.*, *Azotobacter*, *Rhizobium spp.*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Komagataeibacter* e *Pseudomonas*. A *Acetobacter* é uma bactéria proveniente do vinagre que pode converter glicose, glicerol ou qualquer outra substância orgânica em celulose pura. Cabe destacar que a forma da celulose é alterada de acordo com o gênero da bactéria, por exemplo, os gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium* produzem celulose de fibrilas curtas, *Sarcina* produz celulose amorfa, *Alcaligenes* produz CB em forma de fibrilas e a *Komagataeibacter* produz celulose em forma de fitas (MOHAMMEDI, 2017). No entanto, entre as citadas, as espécies do gênero *Komagataeibacter* destacam-se, sendo que cinco dessas tornaram-se foco de pesquisas: *K. xylinus*, *K. hansenii*, *K. rhaeticus*, *K. europaeus* e *K. medellinensis* (BLANCO, HERNÁNDEZ, RIVERO-BUCETA, *et al.*, 2021). O *K.xylinus* é o organismo mais explorado industrialmente, a espécie sofreu reclassificações taxonômicas, por muitos anos foi denominada *Acetobacter xylinum*, posteriormente classificada como *Gluconacetobacter xylinum* e, atualmente é reconhecida como *Komagataeibacter xylinus* (GORGIEVA, TRCEK, 2019).

A *K. xylinus* possui comprimento de 2 à 10 micrômetros e largura que varia de 0,5 à 1 micrômetro, destaca-se pela sua capacidade em produzir níveis mais altos e estáveis do polímero, como seu metabólito primário, a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio (substratos). Basicamente, todo o desenvolvimento de CB pode ser observado a partir da glicose (CHAWLA *et al.*, 2009). Também, as cepas do *K. xylinus* apresentam vantagem pela sua fácil obtenção, podem ser cultivados em laboratórios e são comumente encontrados em frutas e vegetais em processo de

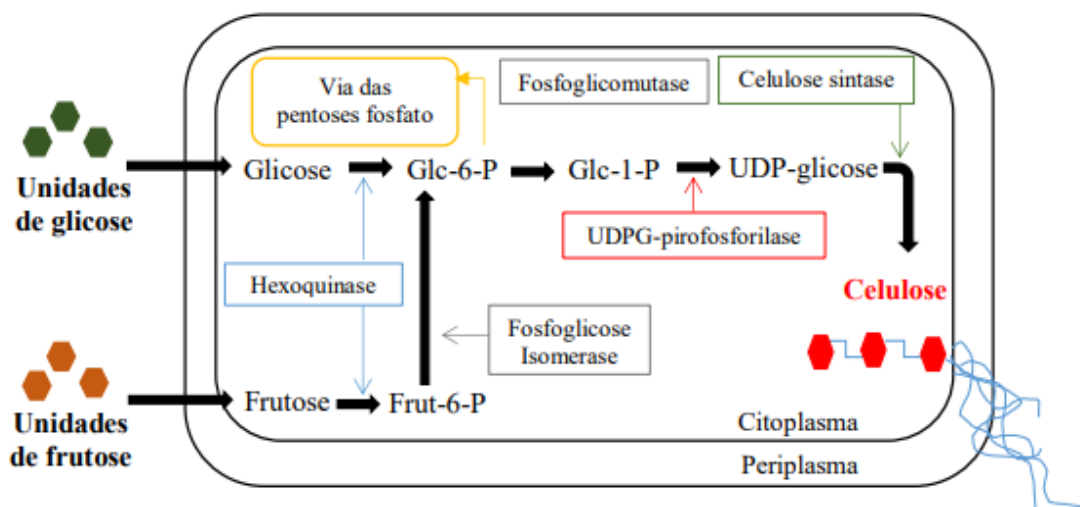
decomposição e em produtos destes (BILGI, BAYR, SENDEMIR-URKMEZ, HAMESS, 2016).

4.3 Biossíntese

O processo de biossíntese da celulose bacteriana pode envolver vias anfibólicas importantes, como o ciclo de Krebs (oxidação dos ácidos orgânicos), o ciclo das pentoses (oxidação dos carboidratos) e a gliconeogênese (conversão de piruvato e glicerol em glicose), esses são processos indiretos (MOHAMMEMDI, 2017). Também, pode ocorrer fosforilação de hexoses, quando a fonte de carboidrato é exógena, nesse processo a conversão da hexose fosfato em celulose é direta, independe de clivagens intermediárias do esqueleto carbônico (DONINI *et al.*, 2010). Logo, a síntese de celulose bacteriana é realizada em diversas etapas, as quais envolvem grande quantidade de enzimas individuais e complexos de proteínas catalíticas e reguladoras (PINTO, 2013).

Como mostra a Figura 3, caso a síntese de CB tenha seu início a partir da frutose ocorrem dois processos para que, assim, a via metabólica possa seguir o mesmo roteiro da síntese iniciada pela glicose. Tais etapas são: fosforilação (ação da enzima hexoquinase, fosforilando frutose em frutose-6-fosfato) e, posteriormente, isomerização (ação da enzima fosfoglicose isomerase, isomerizando a frutose-6-fosfato para glicose-6-fosfato). Após o processo de isomerização, a síntese de produção do biopolímero iguala-se ao processo quando iniciado pela glicose (LEE *et al.*, 2014). Quando iniciada a partir da glicose, a biossíntese do BC requer quatro etapas enzimáticas: (1) fosforilação da glicose pela glucoquinase em glicose-6-fosfato; (2) isomerização de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato por fosfoglucomutase; (3) conversão de glicose-1-fosfato em uridina difosfato glicose (UDP-glicose) por UDP-glicose pirofosforilase; (4) e a síntese de celulose a partir de UDP-glicose pela celulose sintase (MONIRI, BOROUMAND MOGHADDAM, AZIZI, *et al.*, 2017).

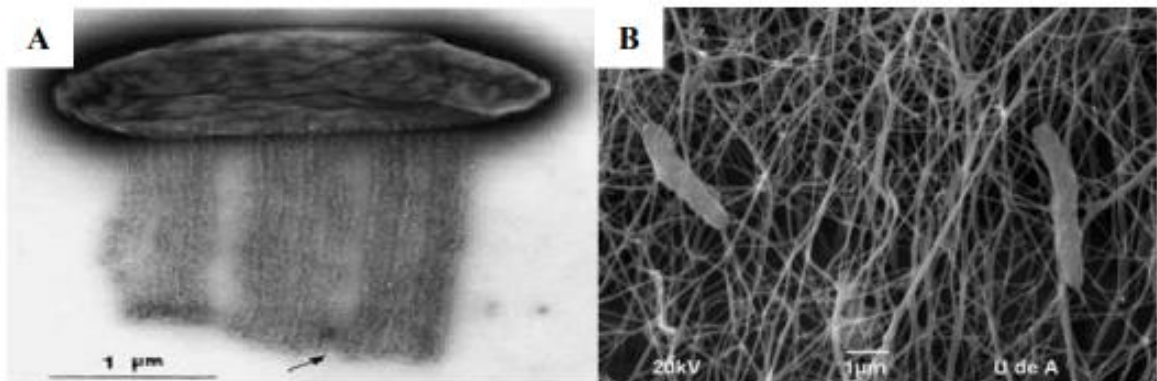
Figura 3 – Ilustração esquemática da via metabólica da síntese de celulose bacteriana através microrganismos.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.* (2014) e NARITOMI *et al.* (1998).

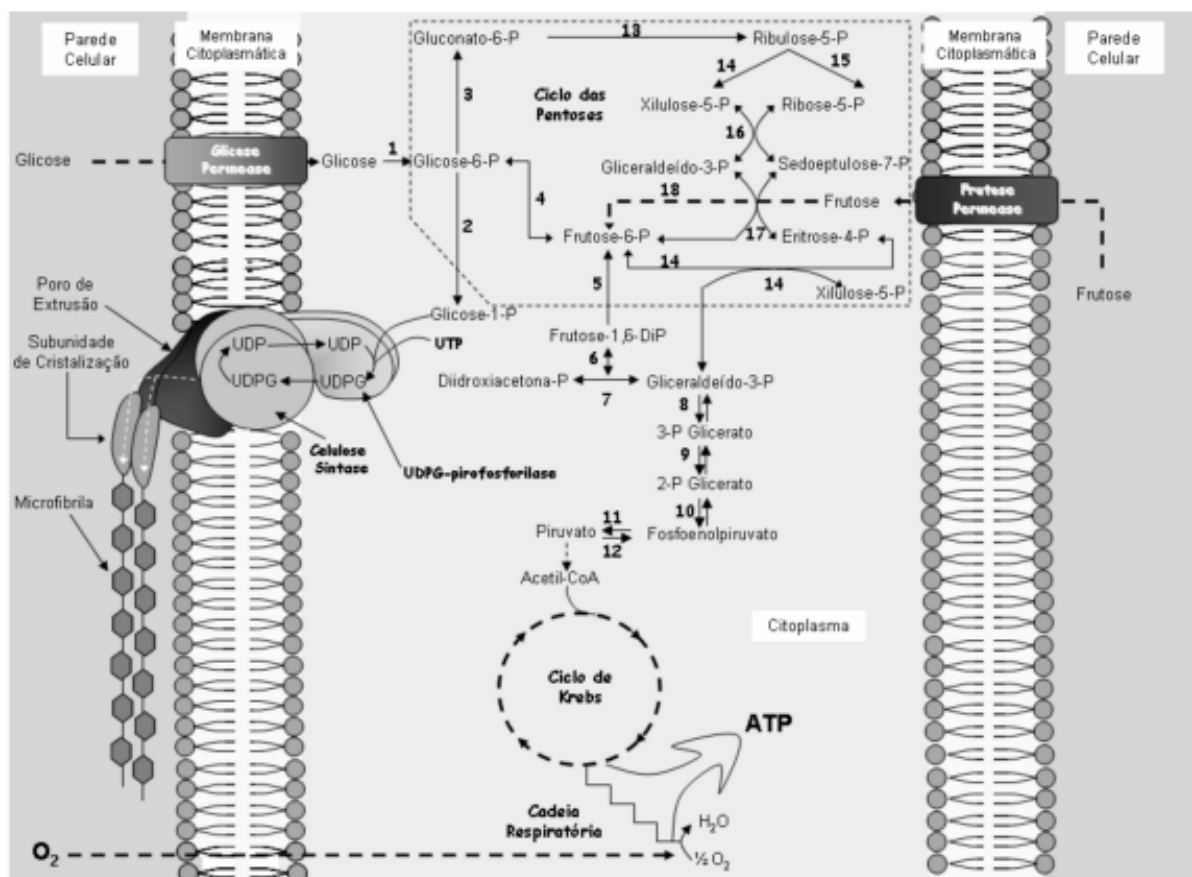
A etapa da celulose sintase tem grande destaque na biogênese da CB, visto que tal enzima pode ser a única exclusiva deste processo (MOHAMMEDI, 2017). A enzima é uma glicosiltransferase incorporada na membrana composta por três (AxCcSAB, AxCcSC e AxCcSD) ou quatro o (AxCcSA, AxCcSB, AxCcSC e AxCcSD) subunidades, sendo que sua subunidade catalítica acarreta em um dos principais determinantes das propriedades químicas e físicas da CB, o que incorre no fato de que diferentes espécies bacterianas são capazes de gerar celulose com diferentes comprimentos. Sabe-se que a celulose sintase ocorrem três etapas principais (Donini *et al.*, 2010). Na primeira etapa ocorre a polimerização da glicose, evento associado à membrana, em cadeias de β -1,4-glucano (os mecanismos moleculares de polimerização da glicose em cadeias longas e não ramificadas ainda precisam ser explorados); secreção extracelular das cadeias lineares (o microrganismo excreta fibrilas elementares, que têm cerca de 1,5 nm de largura, onde estão os poros do microrganismo – Figura 3), e a organização e cristalização das cadeias de glucanos em tiras, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, formam uma rede de nanofibras com diâmetro entre 20 à 90 nm (SOUZA, 2014; ROSS *et al.*, 1991). A Figura 5 representa um modelo da rota metabólica para a biossíntese de celulose por *K. xylinus*, demonstrando as etapas da celulose sintase.

Figura 4 - Microscopia da formação da celulose bacteriana a) *Komagataeibacter xylinus* no momento em que excreta fibrilas elementares; b) rede tridimensional que a bactéria produz.



Fonte: a) BARUD (2010); b) CASTRO *et al.* (2011).

Figura 5 – Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por *K. xylinus* – Glicoquinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato diquinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforribulose epimeraase (14); Fosforribulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19)



Fonte: DONINI, DE SALVI, *et al.*, 2010

4.4 Cultivo de Bactérias para Produção de Celulose Bacteriana

A formação da celulose bacteriana é diretamente afetada pelos meios de fermentação e pelas condições de cultivo, como a composição do meio de cultura, pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido, volume de meio (relação área/volume) e o tipo de cultura utilizada (fermentadores estáticos ou agitados) ofertadas à bactéria, visto que esses fatores interferem na produtividade do microorganismo (LEE, *et al.*, 2013).

Logo, infere-se que encontrar o meio de fermentação adequado é de suma importância para melhor rendimento da produção ao menor custo de processo.

4.4.1 O meio de fermentação

O meio de cultivo tem significância de custo de cerca de 65 % do processo de fermentação, o que equivale à 30 % do custo total do processo de produção de polímeros, limitando-a ao nível industrial (JOZALA, *et al.* 2015; DONINI, *et al.* 2015). O meio de fermentação deve apresentar fonte de carbono, fonte de nitrogênio e aditivos (macro e micronutrientes). Logo, as mudanças nos componentes do meio afetam o crescimento e a formação do produto direta ou indiretamente, assim como o custo (RANI; APPAIAH, 2011).

Os meios sintéticos se dispõem em diferentes formulações, existindo três tipos diferentes: Yamanaka (Y), Zhou (Z) e Hestrin Schramm (HS). Cada um possui suas vantagens e desvantagens, que demonstram como o rendimento é afetado pelo tipo, quantidade e composição do meio. O peso seco final das CBs obtidas no meio Zhou (Z) e Hestrin-Schramm (HS) são maiores do que a CB sintetizada no meio Y, embora a fonte de carbono do meio HS seja metade da do meio Z, ele produz o maior rendimento de CB (MONIRI *et al.*, 2017). O meio utilizado como padrão para a produção da CB é o meio sintético HS (Hestrin Schramm, 1954). Este tem em sua composição glicose e ácido cítrico como fontes de carbono e peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio (HESTRIN & SCHRAMM, 1957). Em valores, ele é composto por 2% (p/v) de glicose, 0,5% (p/v) de peptona, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 0,27% (p/v) de Na_2HPO_4 e 1,15 g/L de ácido cítrico.

A glicose é o açúcar preferencialmente escolhido como fonte de carbono, no entanto, durante o processo ela pode formar ácido glucônico, que reduz o pH do meio de cultura, gerando menor rendimento na produção de CB. Também, ela e os outros nutrientes que compõem o meio de cultivo para a síntese de CB apresentam um alto custo na sua forma pura, em razão disso, outras fontes são estudadas para o meio de cultivo. Como efeito, fontes de carbono oriundas de processos agroindustriais têm recebido incentivos. A atividade agrícola gera uma grande quantidade de biomassa que possui impacto ambiental ao ser descartada de forma incorreta, no entanto, tais

resíduos como cascas de uvas, glicerol bruto, resíduos de levedura de cerveja, melão de beterraba, líquido do sisal (utilizado como repelente contra mosquitos), extrato de algaroba, suco da casca do abacaxi, licor de milho, melão de cana e palha de trigo, entre outros, têm potencial para o processo fermentativo da CB, pois são ricas em açúcares (sacarose, glicose e frutose) e nutrientes (nitrogênio e vitaminas).

Várias fontes de carbono têm sido avaliadas, incluindo monossacarídeos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos, álcoois e álcoois de açúcar, assim, há diversos estudos sobre diferentes fontes de carbono como manitol, frutose, sacarose e açúcares invertidos, na produção da CB.

4.4.2. Influência do pH

Sabe-se que o pH ótimo para a produção de CB, para crescimento adequado das bactérias, é dependente da cepa específica e do microrganismo utilizado. De acordo com a literatura, este valor está na faixa de 4 à 7, abaixo do valor de 3,5 a síntese de celulose é inibida, enquanto a maior eficiência de produtividade está em torno de 6,5. Esses valores também variam de acordo com a finalidade de aplicação, a exemplo da produção industrial de membranas de CB para aplicações biomédicas, por exemplo, Biofill e Gengiflex, que a fim de evitar a contaminação do meio durante o cultivo, variam a pH em faixas consideradas mais baixas, entre 4 e 4,5.

Apesar da produção ocorrer numa faixa considerável de pH, a variação dele durante o processo deve ser levada em consideração. O acúmulo de metabólitos secundários de caráter ácido, como os ácidos glucônico, láctico e acético, que são gerados ao longo com consumo de açúcares e fontes de nitrogênio, podem diminuir o pH do meio durante a produção de CB. Para evitar essa situação é cabível fazer a adição de uma solução tampão durante o processo fermentativo, a fim de se alcançar maior rendimento o possível, visto que as variações no pH durante o processo fermentativo causam alterações na atividade e na síntese enzimática.

4.4.3. Influência da temperatura

A temperatura de operação na produção de CB é outra variável que tem influência direta no rendimento, assim como na estrutura da morfologia e do cristal. Estudos para encontrar a produção máxima foram realizados, neles observou-se que, na faixa de 20 à 40 °C, com meio Hestrin-Schram, a CB foi idealmente produzida a uma temperatura de 30 °C. Apesar de ter sido verificada que não há diferença significativa na produção de celulose à 25° C, a produção começa a decrescer de rendimento a medida que a temperatura atinge valores acima 35° C (SON *et al.*, 2001).

4.4.4 Teor do oxigênio dissolvido

O metabolismo celular é dependente do teor de oxigênio dissolvido no meio, esse parâmetro é essencial tanto para o aumento do rendimento quanto para as propriedades e, conseqüentemente, para a qualidade do polímero final (SHIRAI *et al.*, 1994). O controle desse teor é de suma importância, visto que altas taxas, obtidas no cultivo agitado, podem aumentar a concentração de ácido glucônico, inviabilizando a célula a sintetizar a celulose, enquanto baixas concentrações impedem o crescimento bacteriano e a produção de biopolímero. (HUNGUD e GUPTA, 2010).

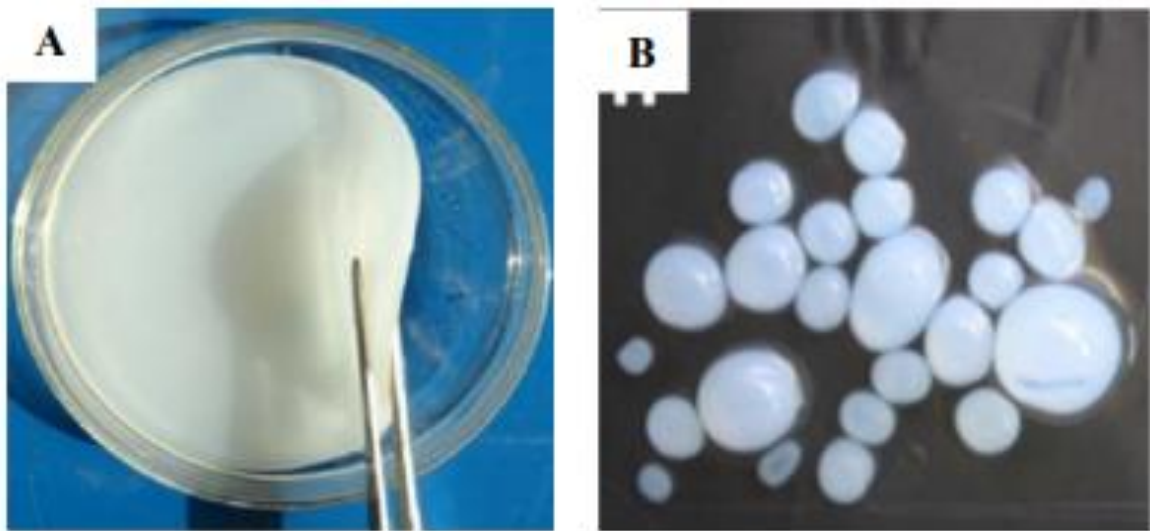
4.4.5 Tipos de biorreatores

A celulose bacteriana pode acontecer sob duas formas de cultivo: estático e agitado, que definem a apresentação do filme, mesmo que a estrutura química seja idêntica (HORNUNG *et al.*, 2006). O tempo médio de 3 à 4 semanas, normalmente necessário para a produção em culturas estáticas, é reduzido para 2 a 4 dias em culturas agitadas, observando um rendimento de 2,5 g/L. (DUDMAN, 1960).

Em culturas estáticas, o crescimento das bactérias produtoras de celulose, assim como a produção do polímero, mesmo que em condições de meio de cultivo mais favoráveis, são baixos, podendo variar entre 10 dias e 6 semanas, em função da cepa utilizada. O rendimento comum na produção de celulose bacteriana, em meios estáticos, é de 5 g/L, após corridos 27 dias de cultivo (LEE *et al.*, 2014). Esse tipo de cultivo requer grande área de superfície da cultura, pois, a CB é sintetizada na forma

de uma película homogênea e gelatinosa entre a interface do meio com o ar, essas possuem maior grau de polimerização e cristalinidade devido à ausência de interferência de forças cisalhantes oriundas da agitação.

Figura 6 – Fermentação em cultivo a) estático e b) agitado de *Komagataeibacter xylinus* K975 que produz celulose bacteriana.



Fonte: (A) HUANG *et al.* (2014) e (B) SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA (2018).

O cultivo em meio agitado ocorre por biorreatores ou frascos com agitação, ele produz taxas mais altas de CB comparadas às do meio estático, pois, a síntese celulósica é mais rápida devido a maior taxa de transferência de oxigênio e de disponibilidade de nutrientes para o interior da membrana. No entanto, nesse processo, a celulose é produzida na forma de bolas sólidas, como grânulos e mechas fibrosas, e, devido ao estresse que cisalhamento causa, detém grau de polimerização resistência mecânica, módulo de elasticidade, e índice de cristalinidade inferiores à CB que é produzida em cultivo estático.

Diferentes tipos de biorreatores vêm sendo utilizados para aumentar a taxa de multiplicação e a produtividade bacteriana com redução do custo de produção, cada um com suas particularidades, como mostra a Tabela 3.

Quadro 2 – Métodos para a produção de celulose bacteriana (CB).

| Métodos para a produção de CB | Características Básicas do Processo e da Celulose |
|-------------------------------|---|
|-------------------------------|---|

| | |
|---|--|
| Produção Estática | <ul style="list-style-type: none"> • Método mais comumente utilizado em escala laboratorial. • Duração do processo em cerca de 2 semanas. • Celulose produzida na forma de folha de hidro gel. |
| Produção em solução agitada | <ul style="list-style-type: none"> • Elevação na taxa de oxigênio entregue à bactéria. • Pode acarretar na redução da estabilidade genética da bactéria e diminuição da produção de CB. • Produção da CB ocorre morfológicamente de maneira variada (majoritariamente estruturas esféricas). • Adequada para produção em escala econômica. |
| Produção em Biorreator Air Lift | <ul style="list-style-type: none"> • Eficiente suprimento de oxigênio com baixo custo de energia. • CB produzida em pellets. |
| Produção em Biorreator de Disco Rotativo | <ul style="list-style-type: none"> • Produção homogênea da CB. • Produto final semelhante a de um processo em meio estático. |
| Produção em Biorreator de Leito Gotejante | <ul style="list-style-type: none"> • Provê alta concentração de oxigênio à bactéria, e baixa força de cisalhamento. • Produto final em forma de folhas irregulares. |

Fonte: Adaptado de Gorgieva e Trček, 2019

5 SUBSTRATOS

5.1 Glicerol como fonte de carbono

Glicerol é o nome dado ao composto orgânico 1,2,3-propanotriol, tri-álcool com 3 carbonos em sua estrutura. Comercialmente, o glicerol recebe, frequentemente, o nome de glicerina (BEATRIZ; ARAÚJO; DE LIMA, 2011). Esse líquido, em sua forma pura, possui gosto adocicado e é incolor, viscoso, inodoro, higroscópico e solúvel em água e álcool, essas duas últimas características são consequência da presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol. Também, é uma molécula que forma ligações de hidrogênio, tanto intramoleculares como intermoleculares, se tornando altamente flexível. (WANG *et al.*, 2001)

O glicerol pode ser obtido de diferentes maneiras, na natureza é encontrado em alguns vegetais, como mamona, palma, girassol, coco e soja; também, pode ser obtido a partir do propeno (proveniente de combustíveis fósseis), gorduras animais e óleos residuais, quando se faz a reutilização destes. (WANG *et al.*, 2001) Também, é um coproduto da produção de biodiesel, assim como a partir do álcool alílico, por via

fermentativa, através de hidrogenação de carboidratos. Nesses casos este resíduo não pode ser utilizado em aplicações tradicionais em que o glicerol normalmente é utilizado, por exemplo nas indústrias farmacêutica e alimentícia, exceto que sejam realizados processos de purificação do composto, fato que é responsável direto na elevação dos custos para a indústria (FREITAS *et al.*, 2010).

O glicerol, como resíduo da produção de biodiesel, aumentou consideravelmente, pois, nos últimos anos, a demanda por biodiesel cresceu. Assim, é necessário que se encontre outras novas rotas de valorização. A utilização deste resíduo para a produção de polímeros microbianos como fonte de substrato pode ser uma delas. (FREITAS *et al.*, 2010).

5.1.1 Estudos com o glicerol

Silva e colaboradores (2017) avaliaram a produção de membranas de celulose variando as fontes de carbono e o tempo de produção. Utilizaram o meio HESTRIN SCHRAMM (1954) modificado - fonte de carbono (8 %), fonte de nitrogênio (extrato de levedura 0,5 %), fonte de aminoácido (peptona bacteriológica 0,5 %), sais (Na_2HPO_4 0,27 %) e ácido cítrico 1,15 % -, com as seguintes variações nas fontes de carbono: glicose 8 % (meio 1), glicerol p.a 6 % mais glicose 2 % (meio 2) e glicerol residual 6 % mais glicose 2 % (meio 3). A produção de celulose ocorreu por fermentação estática em estufa bacteriológica com temperatura de 30 °C. Os meios foram ajustados em pH 5,5. Para cada meio de cultivo de 400 mL foram adicionados 2 *ependorfs* de bactéria padronizadas. Todas as fermentações tiveram o período de 16 dias, sendo que nos dias 8, 10, 14 e 16 foram retiradas triplicatas das amostras de cada meio de cultivo. O estudo mostrou que o meio que continha glicerol residual apresentou produção tardia e de massa reduzida em relação aos outros, no entanto, com relação à espessura, esta apresentou um valor comparável aos outros meios.

Carreira *et al.* (2011) estudaram a produção de celulose bacteriana a partir de diversos resíduos, provenientes de indústrias agro-florestais, como extrato aquoso de cascas de uva, soro de queijo, glicerol bruto e licor de polpação sulfito. Os estudos foram realizados em meio HS, variando a fonte de carbono, em condições estáticas.

Com isso, concluíram que à exceção do glicerol bruto, todos os outros resíduos demonstraram potencial como fontes de carbono para a produção de CB. Sendo que, a melhor produção do biopolímero ocorreu utilizando 20 g.L⁻¹ do glicerol cru com 20 g.L⁻¹ do glicerol purificado no meio, e a produção foi de 2,07 g.L⁻¹ após 96h de incubação. Também, mostrou que a adição de nutrientes como extrato de peptona e levedura ao meio levaram a uma melhoria de 200% na produção.

Zhong *et al.*, (2013) analisaram o fluxo metabólico da *Gluconacetobacter xylinus* para a produção de CB no meio composto por fonte de carbono (0,833 mol C/L), peptona (10 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L) e fosfato dissódico (10 g/L), variando as fontes de carbono como glicose, glicerol e frutose. Essa pesquisa demonstrou que a maior produção foi obtida no meio que continha 25 g.L⁻¹ de glicerol, adicionado de 0,02 % de CaCl₂, com pH ajustado para 6, com um rendimento metabólico de 14,7 g/mol C, o que foi aproximadamente 1,69 vezes (com frutose) e 2,38 vezes (com glicose) maior. Ao longo do processo fermentativo, o pH manteve-se constante, com valores que variaram levemente entre 6 e 7, foi certificado que 47,96 % do glicerol foi transformado em celulose, ao passo que somente 19,05 % de glicose e 24,78 % de frutose foram convertidas. Em relação às características bioquímicas da membrana se mostraram semelhantes às que foram obtidas nos estudos citados. A avaliação das propriedades mecânicas evidenciou que a tensão mecânica para ruptura foi maior no meio do glicerol, apresentando em torno de 83,5 Mpa. Em complemento, a membrana obtida teve maior porosidade e com as fibras do meio de glicerol mais finas.

5.2 Vinhaça e vinhaça fina como fonte de carbono

A vinhaça, também conhecida como vinhoto, é um resíduo líquido, subproduto industrial da destilação do etanol a partir da fermentação de melaço (feito de cana-de-

açúcar ou beterraba sacarina) ou amido de milho (Kretzschmar 1961). Ela é produzida em muitos países do globo, como um subproduto da produção de álcool; considerando ter a matéria-prima diferente, como cana-de-açúcar na América do Sul e da beterraba, na Europa. A vinhaça apresenta diferentes propriedades (GEMTOS et al., 1999). Sabe-se que para cada litro de álcool produzido, são gerados entre 10 e 12 litros de vinhaça (MARAFFON et al., 2019).

Esse resíduo é composto por 93 % de água e 7 % de sólidos orgânicos e inorgânicos (SHINDE et al., 2020). Entre os componentes orgânicos encontra-se glicose, sacarose, citrato, oxalato, ácido láctico, ácido acético, etanol, glicerol, ácido láctico, frutose e galactose, sendo variável a concentração dos mesmos devido aos diversos métodos de processamento e tipo do mosto (HARDER, 2020). Também apresenta alto teor de matéria orgânica, de macro e micronutrientes, altas quantidades de cátions como o potássio (K), ferro (Fe), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e menores quantidades de nitrogênio (N) e fósforo (P) (ALBANEZ et al., 2018).

É conhecida tanto pelo alto poder poluente quanto pelo alto valor fertilizante, decorrentes da sua riqueza em matéria orgânica, altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), baixo pH, elevada corrosividade e também elevada temperatura na saída dos destiladores (FREIRE e CORTEZ, 2000). A vinhaça e a vinhaça fina podem ser utilizadas na forma pura como substrato para a produção de CB, sem qualquer pré-tratamento (Velásquez-Riaño et al. 2013).

5.2.1 Estudos com a vinhaça

Borro (2021) utilizou a vinhaça e a *Aloe vera* (babosa) como um dos substratos para a produção de celulose bacteriana. Neste estudo, utilizou o meio ALABAN modificado, composto por uma substituição da glicose por sacarose – açúcar cristal -, ácido cítrico, fosfato de potássio dibásico anidro, extrato de levedura, sulfato de magnésio e sulfato de amônio. Conclui-se que o uso da vinhaça como substrato apresenta potencial para a produção do biopolímero, promovendo a redução dos altos custos envolvidos na produção de CB e a valorização do uso de resíduos agroindustriais no processo de produção de CB.

Barshan e colaboradores (2019) pesquisaram os efeitos da concentração de vinhaça (%) e tempo de incubação (dia) em diferentes respostas, como espessura e pesos úmidos e secos da membrana CB produzida. Nas condições otimizadas – 40 % vinhaça e 10 dias -, a CB foi caracterizada e comparada com a CB produzida em meio Hestrin Schramm, como meio controle e concluiu-se que suas características permitem a utilização da vinhaça como subproduto, podendo ser utilizada como fonte de carbono barata e adequada

Wu e Liu (2013) estudaram o uso da vinhaça fina, água residual da destilação de vinho de arroz, como suplemento no meio de produção da CB. Analisaram o biopolímero produzido em 3 meios: apenas vinhaça fina, HS e HS-vinhaça fina. Como resultado, observaram que o meio composto por HS e vinhaça fina aumentou a produção de CB em cerca de 3 a 4 vezes, também, a presença de vinhaça reduziu a taxa de consumo de açúcar redutor de *G. xylinus*, levando a um rendimento de conversão CB muito alto (0,57 g-CB/g-açúcar redutor).

5.3 Soro de leite como fonte de carbono

O soro de leite é um subproduto da fabricação convencional de queijos, o qual possui alto teor de matéria orgânica e, em consequência, pode acarretar problemas ambientais conforme a sua destinação. Cerca de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, assim, o seu reaproveitamento tem sido estudado e sugerido para melhorar a eficiência econômica dos laticínios e minimizar os impactos ambientais (PACHECO *et al.*, 2005; BIEGER e RINALDI, 2009).

A composição do soro de leite tem valores médios de 93 % de água; 0,9 à 0,7 % de proteínas; 5 % de lactose; 0,5 à 0,3 % de gordura; e 0,2 % de ácido láctico somados à pequenas quantidades de vitaminas. Já a parte proteica do soro contém em torno de 50 % de b-lactoglobulina; 25 % de a-lactoalbumina; além de 25 % de outras frações proteica as quais incluem imunoglobulinas (FITZSIMONS *et al.*, 2006). Há dois tipos de soro: doce e ácido, o primeiro tem pH de 5,8 à 6,5 e 0,5 % de sais; e o segundo tem pH de 4,5 à 4,8 (PONSANO e CASTRO-GOMEZ, 1995).

5.3.1 Estudos com o soro do leite

Jozala e colaboradores (2015) analisaram a produção de CB em diferentes meios de cultura: HS, frutas podres, soro de leite e uma mistura de frutas e soro de leite. Observaram que *G. xylinus* metaboliza preferencialmente monossacarídeos como frutose e glicose. Isso explica o porquê do soro de leite, que contém lactose, um dissacarídeo, em abundância, produz o menor valor de rendimento (5,9 mg/mL) dos meios de cultura observados.

Tabaii e Emtiazi (2016) conduziram um estudo que avaliou o efeito de várias fontes de carbono, ou seja, monossacarídeos como frutose e glicose, dissacarídeos como sacarose com e sem qualidade alimentar, álcoois de açúcar como manitol e glicerol, soro de leite e amido de qualidade alimentar no peso seco, na produção de CB. A CB foi produzida estaticamente em meio Hestrin-Schramm (HS) (30 ml) composto por D-glicose (20 g l⁻¹), peptona (5g l⁻¹), extrato de levedura (5g l⁻¹), Na₂HPO₄ (2,7 g.L⁻¹) e ácido cítrico (1,15 g.L⁻¹) (pH 6,0) à 28 ° C, por 20 dias. A D-glicose foi substituída por outras fontes de carbono em meio HS modificado. Entre as conclusões, o consenso final foi de que os rendimentos de CB de soro de leite e do amido de qualidade alimentar foram baixos.

6 Conclusão

A celulose é um polímero produzido em grande escala por muitas indústrias, com vasta gama de aplicação, mas ainda obtida por métodos não amigáveis com o meio ambiente (BOLDRIN, 2015). O motivo pelo qual algumas bactérias produzem celulose é variado entre autores do mundo todo, porém, todos concordam no ponto de que é uma membrana protetora criada pelo microrganismo para conseguir se isolar do meio externo (IGUCHI *et al.*, 2000).

A produção de celulose pode ser realizada através de vias metabólicas de algumas bactérias, que, além de ser um processo com viés mais natural em relação à produção restrita às vias químicas, é um produto de maior qualidade, em termos de

grau de pureza e de resistência do material em si. Dentre as cepas, a mais utilizada é a *Komagataeibacter xylinus*, pois conseguem produzir celulose a partir de diversas fontes de carbono distintas (KLEMM *et al.*, 2001; DONINI *et al.*, 2010). A relevância da celulose bacteriana está em seus menores custos de produção, menor tempo de processamento e aumento das aplicações industriais.

Dessa forma, a produção de celulose através de vias metabólicas da bactéria *Komagataeibacter xylinus* funciona como uma alternativa que traz um produto de maior qualidade, assim como vantagens para o meio ambiente. A formação da celulose bacteriana é diretamente afetada pelos meios de fermentação e pelas condições de cultivo - como temperatura, pH, teor de O₂ dissolvido, relação área por volume do meio reacional, composição do meio de cultura, tipo de condição utilizada (fermentadores estáticos ou agitados) – que são ofertadas à bactéria, visto que esses fatores interferem na produtividade do microrganismo (LEE *et al.*, 2013).

Em geral, os resultados obtidos neste trabalho, ao analisar diferentes substratos nos meios de cultura, mostraram que alguns resíduos industriais podem servir como substratos de carbono para a produção de CB. Os resultados obtidos em termos de rendimentos de CB foram semelhantes ou até melhores do que aqueles com os respectivos compostos puros em um meio padrão. O uso de substratos complexos para produção de CB não afetou negativamente a qualidade das propriedades físico-químicas, inclusive em alguns casos, foi demonstrado como a alteração dos substratos e da forma como o meio é conduzido (alteração de pH, condições estáticas ou de agitação) podem gerar características específicas e desejadas. No entanto, é possível observar que alguns substratos, como o soro do leite, não apresentam vantagem produtiva em relação ao meio padrão (HS). Logo, infere-se que encontrar o meio de fermentação adequado é de suma importância para melhor rendimento da produção ao menor custo de processo.

7 Referências

ALTANER, Clemens M.; THOMAS, Lynne H.; FERNANDES, Anwasha N.; JARVIS, Michael C. How Cellulose Stretches: Synergism between Covalent and Hydrogen

Bonding. **BioMacromolecules**, [s. l.], 2014. DOI dx.doi.org/10.1021/bm401616n. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bm401616n>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ALBANEZ, R. et al. Feasibility of biohydrogen production by Co-digestion of vinasse (Sugarcane stillage) and Molasses in an Ansbbr. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27–41, 2018.

BARUD, H. S.; REGIANI, T. S.; MARQUES, R. F. C.; LUSTRI, W. R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, New York, v.11, 8 p., feb. 2011.

BARSHAN; BARI; ALMASI, et al. Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by Komagatacibacter xylinys PTCC 17344 using vinasse as a cheap cultivation medium. **International journal of biological macromolecules**, 2019.

BEATRIZ, Adilson; ARAÚJO, Yara JK; LIMA, Dênis Pires de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BILGI, Eyup et al. Optimization of bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus using carob and haricot bean. **International journal of biological macromolecules**, v. 90, p. 2-10, 2016.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Florianópolis, 2009. 1 CD-ROM.

BLANCO, Francisco G. et al. From residues to added-value bacterial biopolymers as nanomaterials for biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, p. 1492, 2021

BOLDRIN, L.F. **Biossíntese, Aplicabilidade e Recentes Avanços no Estudo da Celulose Bacteriana**. Trabalho de Graduação apresentado à Escola de Engenharia de Lorena, como requisito parcial para conclusão da Graduação no curso de Engenharia Bioquímica, 2015.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172-180, 2016.

CAMPANO, C.; BALEA, A.; BLANCO, A. et al. **Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review**. Cellulose. v. 23, n. 1, p. 57-91, 2016.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Utilization of residues agro-forest industries in

the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102 , n. 15, p. 7354- 7360, 2011.

CASTRO, C.; ZULUAGAB,R.; PUTAUXC, J.; CAROA, G.; MONDRAGOND, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 96–102, 2011.

CHAWLA, Prashant R.; BAJAJ, Ishwar B.; SURVASE, Shrikant A.; SINGHAL, Rekha S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 47, 2009.

COIMBRA, Cynthia Gisele de Oliveira. **PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR *Gluconacetobacter xylinus* E ELABORAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS**. Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto Maior. 2016. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. /], 2016.

DEPEC/BRADESCO. Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos do Bradesco: Divulga dados econômicos setoriais no contexto macroeconômico. **DEPEC/BRADESCO**, 2016.

DONINI, I.A.N.; DE SALVII, D. T. B.; FUKUMOTOI, F. K.; LUSTRIII, WILTON R.; BARUDI, H. S.; MARCHETTOI, R.; MESSADDEQI, Y.; RIBEIROI, S.J. L. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Eclét. Quím.** vol.35 no.4 São Paulo 2010.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials. Berlin: **Walter de Gruyter GmbH**, 2012.

EICHHORN, S.J., BAILLIE, C.A., ZAFEIROPOULOS, N., et al., Review – “Current international research into cellulosic fibres and composites”, **Journal of Materials Science**, v.36, pp. 2107-2131, 2009.

FAN, Xin et al. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacterxylinus*. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 1068-1072, 2016.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M. et al. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.62-69, 2006.

GUPTA, P. et al. An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. **IntechOpen**, v. 1, p. 1 - 21, 2019.

DE MORAES CHITOLINA, Gustavo; HARDER, Márcia Nalesso Costa. Avaliação da viabilidade do uso de vinhaça como adubo. **Bioenergia em Revista: Diálogos** (ISSN: 2236-9171), v. 10, n. 2, p. 08-24, 2021.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose, Houten**, v. 21, p. 1-30, oct. 2014.

JALILI TABAII, M.; EMTIAZI, G. Comparison of Bacterial Cellulose Production among Different Strains and Fermented Media. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 35-41, 30 Dec. 2015.

JOZALA A.; PÉRTILE R, DOS SANTOS C., DE CARVALHO V., et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99(3), 1181–1190. , 2015.

LAMPUGNANI E., FLORES-SANDOVAL E., TAN Q., MUTWIL M, et al. Cellulose Synthesis - Central Components and Their Evolutionary Relationships. **Trends Plant Sci.** 2019 May;24(5):402-412. doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.011. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30905522.

LEE, K.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 10–32, 2014.

LEE, Koon-Yang et al. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10-32, 2014.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society reviews**, London, v. 40, p. 3941-3994, 2011.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 101–110, mar. 2014.

Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, et al. Produção e Status da Celulose Bacteriana na Engenharia Biomédica. **Nanomateriais (Basileia)** . 2017;7(9):257. Publicado em 4 de setembro de 2017.

PACHECO, Maria Teresa Bertoldo et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 333-338, 2005.

PONSANO, E. H. G.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Fermentação de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua capacidade poluidor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.2, p.170-173, 1995.

Takaaki Naritomi, Tohru Kouda, Hisato Yano, Fumihiro Yoshinaga. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 85, p.598-603, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80012-3).

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.). **Monomers, polymers and comp. from renewable resources**. Amsterdã: Elsevier, 2008, p. 369-383.

RANI, M. U.; APPAIAH, A. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. **Annals of microbiology**, Milano, v. 61, p. 781–787, feb. 2011.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied microbiology and biotechnology**, Heidelberg, v. 99, n. 6, p. 2491- 2511, mar. 2015.

KADIER, Abudukeremu et al. Use of industrial wastes as sustainable nutrient sources for bacterial cellulose (BC) production: Mechanism, advances, and future perspectives. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3365, 2021.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesised cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

MONIRI, Mona et al. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials*, v. 7, n. 9, p. 257, 2017. GEDF-CD/FIEP (2016) - Federação das Indústrias do Estado do Paraná. **Panorama Setorial Indústria de celulose, papel, embalagens e artefatos de papel**.

RIBES, Débora Duarte; ZANATTA, Paula; GATTO, Darci Alberto; MAGALÃES, Washington Luiz Esteves; BELTRAME, Rafael. Produção de suspensões nanofibrilares de celulose vegetal por meio de processo combinado: Avaliação do gasto energético. **REVISTA MATERIA**, [s. l.], v. 23, ed. 4, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/n7gmfmDbQwyD6rVDNzgRvfq/?format=pdf&lang=pt>.

Gorgieva S, Trček J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(10):1352. Published 2019 Sep 20. doi:10.3390/nano9101352

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of materials science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

MOHAMMADKAZEMI, Faranak; AZIN, Mehrdad; ASHORI, Alireza. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydratepolymers**, v. 117, p. 518-523, 2015.

MOHAMMEDI, Z. Structure, Properties and Medical Advances for Biocellulose Applications : A Review. **American Journal of Polymer Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 89–96, 2017.

PEREZ, Serge; SAMAIN, Daniel. Structure and engineering of celluloses. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 64, p. 25-116, 2010.

PINTO, Ana Margarida Cerqueira. **Modificação in situ e ex situ da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades**. 2013. Tese de Doutorado.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Review**, v.55, n.1, Mar, p.35-58. 1991.

SHINDE, P. A. et al. Distillery spent wash: An emerging chemical pool for next generation sustainable distilleries. **Journal of Water Process Engineering**, v. 36, p. 101353, 1 ago. 2020.

SILVA, K. et al. Celulose Bacteriana Produzida a Partir de Glicerol Residual da Produção de Biodiesel. In: **ANAIS DO simpósio DE bioquímica E BIOTECNOLOGIA**, 2017, . Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2017.

Singh A, Walker KT, Ledesma-Amaro R, Ellis T. **Engineering Bacterial Cellulose by Synthetic Biology**. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):9185. Published 2020 Dec 2. doi:10.3390/ijms21239185

SINGHSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different Komagataeibacter xylinus strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose, Houten**, v. 25, p. 1571–1581, feb. 2018.

SOUZA, Samara Silva de et al. **Biologia sistêmica da produção de celulose bacteriana através da reconstrução metabólica da Gluconacetobacter hansenii**. 2014.

VAZQUEZ A., FORESTI L., CERUTTI P., GALVAGNO M. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by Gluconacetobacter xylinus. **Journal of polymers and the environment**, 21, 545-554. doi: [10.1007/s10924-012-0541-3](https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3)

VELÁSQUEZ-RIAÑO, M. et al. Cellulose production by Gluconacetobacter kakaiceti GM5 in two batch process using vinasse as culture media. **Water Science and Technology**, v. 68, n. 5, p. 1079–1084, 2013.

WANG, Y.; CHEN, L. Impacts of nanowhisker on formation kinetics and properties of allcellulose composite gelsl. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 1937–1946, nov. 2011.

WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v.19, n.3, p.201-223, jun.2001.

WU, J. M.; LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 284–290, 2013

ZHONG, Cheng et al. Metabolic flux analysis of Gluconacetobacter xylinus for bacterial cellulose production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189-6199, 2013.

