



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO JOSÉ GOMES

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE CELULOSE E ÁCIDO
ACÉTICO, POR BACTÉRIAS DE VINAGRES, A PARTIR DE
MELAÇO DE SOJA**

Londrina
2017

RODRIGO JOSÉ GOMES

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE CELULOSE E ÁCIDO
ACÉTICO, POR BACTÉRIAS DE VINAGRES, A PARTIR DE
MELAÇO DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Coorientador: Dr. Raúl J. H. Castro-Gómez

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gomes, Rodrigo José.

Produção simultânea de celulose e ácido acético, por bactérias de vinagres, a partir de melaço de soja / Rodrigo José Gomes. - Londrina, 2017.
100 f. : il.

Orientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientador: Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Coproduto - Tese. 2. Soja - Tese. 3. Fermentação - Tese. 4. Celulose - Tese. I. Spinosa, Wilma Aparecida . II. Castro-Gómez, Raúl Jorge Hernan . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

RODRIGO JOSÉ GOMES

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE CELULOSE E ÁCIDO
ACÉTICO, POR BACTÉRIAS DE VINAGRES, A PARTIR DE
MELAÇO DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Wilma Aparecida
Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 15 de maio de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais
Angela e José e a minha irmã Janaina.
Todo o meu amor a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar saúde física e mental, sabedoria, perseverança, força e dedicação durante todo o trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Wilma, pela confiança, generosidade, orientação e amizade. Obrigado pela ajuda em todos os momentos, pelos conselhos fornecidos, pelas palavras de incentivo e por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Raúl, pela primeira oportunidade ainda na graduação, como orientador de iniciação científica, despertando em mim o gosto pela pesquisa acadêmica. Obrigado pela amizade, incentivo e conhecimentos transmitidos.

Aos que contribuíram com o trabalho, em especial à Paula, pela contribuição nas análises de caracterização da celulose, ao Leonel, pela ajuda fornecida nas análises de minerais e ao Tiago e Lycio pelas análises cromatográficas. Muito obrigado. Vocês foram muito importantes para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme, do departamento de Estatística, pela ajuda fornecida.

Aos docentes do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e aos técnicos dos laboratórios, Alessandra, Rúbens e Patrícia.

À minha família, em especial meus pais Angela e José e minha irmã Janaina, por todo o amor e paciência, por ser minha base e porto seguro.

À querida amiga Denise, pela amizade sincera e pela grande generosidade, sempre disposta a ajudar.

Às amigas Tainá, Marcela e Mariana, pela agradável companhia durante os dias no laboratório.

Às amigas do mestrado, Thaís, Mayara, Camila, Milena e Thamyres.

Aos amigos, ainda que nem sempre presentes, mais sempre guardados no coração, César, Dilma, Cristiane e Rodrigo.

Às estagiárias do laboratório, Fernanda, Tamara e Tayara.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos fornecida. Foi fundamental para a continuidade do trabalho.

À Embrapa Tropical, pelos materiais fornecidos para execução das análises.

À todos que contribuíram e estiveram presentes de alguma forma, com uma palavra de incentivo, ajuda nos experimentos ou companhia durante este período importante em minha vida.

GOMES, Rodrigo José. Produção simultânea de celulose e ácido acético, por bactérias de vinagres, a partir de melaço de soja. 2017. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O melaço de soja é um coproduto industrial, gerado após o processo de obtenção do concentrado proteico a partir do farelo desengordurado. Possui mais de 50% de carboidratos, dos quais os principais são a sacarose, a estaquiose e a rafinose. Devido à sua alta concentração de açúcares, o melaço pode ser utilizado como um substrato fermentativo, objetivando a obtenção de metabólitos microbianos de interesse, como o ácido acético e a celulose bacteriana, ambos sintetizados por bactérias do ácido acético. Estas bactérias compreendem uma variedade de microrganismos que são utilizados na produção de vinagre, devido à elevada capacidade de oxidar o etanol a ácido acético. Baseado nisto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias do ácido acético, isoladas a partir de indústria produtora de vinagres, em sintetizar celulose e ácido acético em meio contendo melaço de soja como fonte de carbono e nitrogênio. Foram isoladas cinco linhagens de bactérias capazes de produzir ácido e celulose, identificados por testes bioquímicos. Para as linhagens selecionadas, foram determinados os rendimentos quanto à produção de celulose e acidez, na fermentação do melaço de soja. A cepa V05 apresentou a maior produção de celulose tanto no meio Hestrin-Schramm (HS), de referência, quanto no melaço de soja. Neste meio obteve-se um aumento de quase 3 na síntese do biopolímero, alcançando-se uma produção máxima de 10 g L⁻¹. A acidez máxima obtida foi de 1,9 g 100 mL⁻¹ de ácido acético, o que correspondeu a um rendimento de 92,6%. Ao final da fermentação, os monossacarídeos frutose e glicose foram os principais carboidratos consumidos, não havendo consumo dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose. As membranas de celulose produzidas no meio base de melaço de soja e no meio HS, por cada microrganismo, foram caracterizadas quanto a cristalinidade, termogravimetria, estrutura química, capacidade de retenção de água e taxa de reidratação. Houve diferença na taxa de produção e nas características hidrofílicas das membranas tanto entre os microrganismos produtores quanto entre os substratos utilizados, possivelmente por diferenças estruturais da celulose produzida em cada meio e por cada microrganismo. Os resultados obtidos demonstram que o melaço de soja pode representar uma interessante alternativa aos meios de cultura convencionais, podendo obter-se maiores rendimentos de produção do que aqueles obtidos no meio padrão para a síntese de celulose.

Palavras-chave: Coproduto. Soja. Microrganismos. Fermentação. Celulose.

GOMES, Rodrigo José. Simultaneous production of cellulose and acetic acid by bacteria isolated from vinegar, using soybean molasses as substrate. 2017. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Soybean molasses is an industrial by-product, generated after production of soy protein concentrate from defatted soybean meal. It has more than 50% of carbohydrates, mainly sucrose, stachyose and raffinose. Due to its high concentration of sugars, soybean molasses can be used as a fermentative substrate by microorganisms, aiming to obtain metabolites, such as acetic acid and bacterial cellulose, both synthesized by acetic acid bacteria. These bacteria comprise a variety of microorganisms that have been used in the vinegar production because of their high ability to oxidize ethanol to acetic acid. Therefore, this work aimed to evaluate the potential of acetic acid bacteria, isolated from vinegar industry, to synthesize bacterial cellulose and acetic acid in a medium containing soybean molasses as source of carbon and nitrogen. Five strains of acid and cellulose producing bacteria, identified after biochemical tests, were obtained, were isolated. For the selected strains, the cellulose production and acidity yields were determined in the fermentation of soybean molasses. The V05 strain exhibited the highest cellulose production yield in both standard Hestrin-Schramm and soybean molasses-based medium. In this medium, an increase of about three times in the synthesis of the biopolymer was obtained, reaching a maximum production of 10 g L⁻¹. The maximum acidity obtained was 1.9 g 100 mL⁻¹ acetic acid, which corresponded to a yield of 92.6%. The maximum acidity obtained was 1.9 g 100 mL⁻¹, which corresponded to 92.6% yield. At the end, the monosaccharides fructose and glucose were the main carbohydrates consumed. No consumption of oligosaccharides raffinose and stachyose was observed. The cellulose produced in soybean molasses and standard medium for each microorganism were characterized in relation to crystallinity, thermogravimetry, chemical structure, water holding capacity and rehydration ratio. There was difference in production rate and hydrophilic properties for both producing microorganisms and substrates used, possibly due to structural differences in the cellulose produced in each medium and for each microorganism. The results obtained demonstrate that soybean molasses may represent an interesting culture media and it can provide higher fermentation yields than those obtained in the standard medium for cellulose production.

Key words: Co-product. Soybean. Microorganisms. Fermentation. Cellulose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	Linhagens de bactérias <i>Acetobacter Aceti</i> (esquerda) e <i>Gluconobacter oxydans</i> (direita) após crescimento em ágar DSM.	27
Figura 2	Reações químicas ocorridas nas etapas de fermentação alcoólica e acética para obtenção do vinagre.	33
Figura 3	Estrutura da celulose.	39
Figura 4	Esquema da síntese de celulose bacteriana.	42
Figura 5	Processo de produção do concentrado proteico e do melaço de soja.	47
Figura 6	Estrutura dos oligossacarídeos da soja.	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1	Produção máxima de celulose bacteriana pelos microrganismos V01, V02, V03, V04 e V0577
Figura 2	Acompanhamento do pH e acidez ao longo da fermentação para os microrganismos V01, V02, V03, V04 e V05.78
Figura 3	Percentual de conversão dos açúcares consumidos no melaço de soja após a fermentação..81
Figura 4	Curvas de TGA das membranas de celulose bacteriana produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL)..... 82
Figura 5	Difratogramas de difração de raios-x das membranas de celulose produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL) 83
Figura 6	Resultados de FT-IR das membranas de celulose produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL) pelos microrganismos V01 e V02 (a) e V03, V04 e V05 (b)..... 85
Figura 7	Capacidade de retenção de água (a) e taxa de reidratação (b) das membranas de celulose bacteriana produzidas.87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Características diferenciais dos principais gêneros de BAA.	25
Tabela 2	Principais meios utilizados para isolamento, cultivo e diferenciação de BAA.	28
Tabela 3	Principais meios sintéticos utilizados para produção de celulose.	29
Tabela 4	Matérias-primas utilizadas na produção de celulose bacteriana relatadas na literatura.	44
Tabela 5	Composição centesimal aproximada do melaço de soja	49

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição físico-química do melaço de soja.	74
Tabela 2	Caracterização bioquímica dos microrganismos isolados.	75
Tabela 3	Parâmetros de produtividade e consumo dos açúcares do melaço de soja para os microrganismos estudados.	80
Tabela 4	Resultados das análise termogravimétrica e difração de raios-x: Parâmetros de T_{onset} , $T_{10\%}$, perda de massa a 600 °C (%), resíduo a 550 °C (%) e grau de cristalinidade das membranas de celulose	82
Tabela 5	Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas produzidas pelos microrganismos no melaço de soja (MEL).	88
Tabela 6	Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas produzidas pelos microrganismos no meio HS de referência (CP).....	88
Tabela 7	Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas entre os substratos utilizados pelos microrganismos (melaço de soja – MEL e meio HS de referência – CP)..	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REFERÊNCIAS	19

CAPÍTULO 1:

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1	Bactérias do Ácido Acético	21
1.1.1	Taxonomia, Morfologia e Características	21
1.1.2	Isolamento e Identificação Fenotípica	25
1.1.3	Identificação Molecular	30
1.1.4	Métodos de Contagem	31
1.1.5	Produtos do Metabolismo de Bactérias do Ácido Acético	32
1.1.5.1	Vinagre e ácido acético	32
1.1.5.1.1	Método tradicional ou lento	33
1.1.5.1.2	Método rápido	34
1.1.5.1.3	Método submerso	35
1.1.5.2	Kombucha	35
1.1.5.3	Ácido glucônico	36
1.1.5.4	Sorbose e ácido ascórbico	37
1.1.5.5	Cacau.....	38
1.1.5.6	Celulose	39
1.1.5.6.1	Substratos para bioprodução de celulose por bactérias	43
1.1.5.6.1.1	Melaço de soja.....	46
4	REFERÊNCIAS	49

CAPÍTULO 2:

Artigo – Bactérias do ácido acético: Isolamento, seleção e avaliação da capacidade de síntese de celulose bacteriana e ácido acético, a partir de melaço de soja	64
RESUMO	64
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Material	66
2.1.1 Matéria-Prima.....	66
2.1.2 Microrganismos.....	66
2.2 Métodos	66
2.2.1 Caracterização da Matéria-Prima.....	66
2.2.2 Isolamento dos Microrganismos.....	68
2.2.3 Caracterização Bioquímica dos Microrganismos	68
2.2.4 Preparo do Inóculo e Produção de Celulose e Ácido Acético	69
2.2.5 Caracterização dos Produtos da Fermentação	70
2.2.5.1 Produção de ácido	70
2.2.5.2 Consumo de açúcares	70
2.2.5.3 Caracterização da celulose bacteriana	71
2.2.5.3.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	71
2.2.5.3.2 Difração de raios-x (DRX)	71
2.2.5.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	71
2.2.5.3.4 Capacidade de retenção de água (CRA)	71
2.2.5.3.5 Taxa de reidratação (TR)	72
2.2.6 Parâmetros De Rendimento E Produtividade.....	72
2.2.6.1 Cálculo de rendimento em ácido acético	72
2.2.6.2 Rendimento e produtividade da celulose bacteriana.....	73
2.2.7 Análise Estatística.....	73

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1	Caracterização Físico-Química do Melaço de Soja	73
3.2	Isolamento e Caracterização Bioquímica dos Microrganismos	75
3.3	Produção e Caracterização da Celulose Bacteriana e Fermentado Acético	76
3.3.1	Consumo de Açúcares.....	79
3.3.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	79
3.3.3	Análise de Difração de Raios-X	83
3.3.4	Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	84
3.3.5	Propriedades Hidrofílicas	86
3.3.6	Análise de Variância (ANOVA).....	87
4	CONCLUSÕES	89
5	REFERÊNCIAS	90
	CONCLUSÃO GERAL	97
	ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

Produtos biotecnológicos, obtidos através de processos fermentativos com uso de microrganismos, têm atraído interesse de pesquisas, seja com a finalidade de aperfeiçoar processos já existentes, seja para reduzir custos operacionais ou mesmo para a busca de caminhos ainda não descobertos.

O vinagre, cujo principal constituinte é o ácido acético, é um produto originado durante a fermentação espontânea de mostos de vinhos, sendo um condimento utilizado há milênios e conhecido no mundo todo. De acordo com a Associação Nacional das Indústrias de Vinagre, anualmente no Brasil são comercializados cerca de 174 milhões de litros de vinagre em supermercados (ANAV, 2017). A média brasileira de consumo *per capita* é de 0,8 L/ano. Este valor é ainda considerado moderado quando comparado à média europeia, onde o vinagre assume outras funções, tais como desinfetante e neutralizador de odor, e chega-se a um consumo *per capita* de 1,8 L/ano (SPINOSA et al., 2015).

Outros produtos também passíveis de serem obtidos através de via biotecnológica são os polissacarídeos. Eles podem ser extraídos de vegetais, algas marinhas ou sintetizados por microrganismos. São muito utilizados pela indústria de alimentos por suas propriedades espessantes e geleificantes. Podem ainda auxiliar na emulsificação, controle de cristalização e absorção/ retenção de água.

Os polissacarídeos originados em processos fermentativos possuem propriedades similares ou mesmo superiores aos tradicionais, de origem vegetal, uma vez que são menos suscetíveis a variações na sua qualidade e permitem que seu processo de produção seja cuidadosamente controlado, alcançando-se melhores resultados em um menor tempo de produção. Porém, eles têm como principal desvantagem o custo do processo fermentativo (MAUGERI FILHO, 2001). Entre estes polissacarídeos produzidos por microrganismos, está a celulose bacteriana, um polímero excretado por bactérias em mostos contendo fontes de carbono e nitrogênio, que apresenta propriedades específicas, não encontrados na celulose vegetal. Além disso, produção microbiológica da celulose bacteriana não apresenta impactos ambientais como os causados na produção industrial de papel e celulose vegetal. Apesar das diversas propriedades atribuídas à celulose bacteriana, tanto na indústria de alimentos quanto na indústria medicinal, os custos associados com os meios de cultura limitam a sua produção.

Atualmente, as pesquisas visando à obtenção de produtos biotecnológicos têm se esforçado na busca de matérias-primas mais acessíveis, com alto potencial fermentativo, que forneçam maior rendimento e possam reduzir os custos do processo. Uma vez que as fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura representam o principal custo, em geral, a utilização de fontes alternativas pode tornar viável a produção em escala industrial. Além do mais, o reaproveitamento de coprodutos e resíduos agroindustriais gerados durante processamento industrial é benéfico para o meio ambiente (CHIMILOVSKI et al., 2011; JOZALA et al., 2015).

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma das leguminosas mais importantes e consumidas no mundo sendo utilizada na produção de diversos produtos (KIM et al., 2014). Atualmente a produção de soja no Brasil representa cerca 30% do total produzido no mundo, ocupando a segunda posição no ranking mundial. Segundo levantamento da Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - FIESP, o Brasil teve recorde de 111,0 milhões de toneladas produzida na safra de 2016/17, representando um aumento de 15% em relação à safra anterior (FIESP, 2017).

O melaço de soja é um coproduto gerado em grandes quantidades durante o processamento da soja e que representa uma alternativa viável aos meios de cultura convencionais, por possuir quantidades significativas de carboidratos e fontes de nitrogênio, passíveis de serem assimiladas por microrganismos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial de síntese de celulose bacteriana e ácido acético por linhagens de bactérias isoladas de uma indústria produtora de vinagres, utilizando como substrato fermentativo o melaço de soja.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar bioquimicamente linhagens de bactérias, produtoras de ácido e celulose, a partir de indústria de vinagres;
- Determinar a composição química do melaço de soja em relação aos teores de açúcares, proteínas, lipídeos e minerais;

- Fermentar o melaço de soja e determinar os rendimentos das linhagens selecionadas em relação à síntese de ácido e celulose bacteriana;
- Caracterizar as membranas de celulose obtidas em meio de referência e no melaço de soja em relação às características estruturais (cristalinidade, termogravimetria, estrutura química, capacidade de retenção de água e taxa de reidratação).

3. REFERÊNCIAS

ANAV - Associação Nacional das Indústrias de Vinagre. **Indústria investe no vinagre de grife de olho nos gourmets:** Empresários do setor apostam no consumo maior das chamadas linhas especiais. Disponível em: < http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=25>. Acesso em: 05 mar. 2017.

CHIMILOVSKI, J. S.; HABU, S.; TEIXEIRA, R. F. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NOSEDA, M. D.; MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Antitumour activity of *Grifola frondosa* exopolysaccharides produced by submerged fermentation using sugar cane and soy molasses as carbon sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 359-363, jul./set. 2011.

FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Informativo DEAGRO:** Safra Mundial de Soja 2016/17 - 12º Levantamento do USDA, São Paulo: Departamento do Agronegócio - DEAGRO/FIESP, abr. 2017. Disponível em: < http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/boletim_soja_abril2017/>. Acesso em: 23 maio. 2017.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA JÚNIOR, A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181-1190, fev. 2015.

KIM, E.-H.; LEE, O.-K.; KIM, J. K.; KIM, S.-L.; LEE, J.; KIM, S.-H.; CHUNG, I.-M. Isoflavones and anthocyanins analysis in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) from three different planting locations in Korea. **Field Crops Research**, v. 156, p. 76-83, fev. 2014.

MAUGERI FILHO, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociencia Industrial: Processos Fermentativos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. p. 125-149.

SPINOSA, W. A.; SANTOS JÚNIOR, V.; GALVAN, D.; FIORIO, J. L.; GOMEZ, R. J. H. C. Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 1, p. 196-201, jan./mar. 2015.

A dissertação apresenta-se na forma de 2 capítulos, descritos abaixo, seguidos da conclusão geral e anexos:

Capítulo 1:

Revisão Bibliográfica – Bactérias do Ácido Acético;

Capítulo 2:

Artigo – Bactérias do ácido acético: Isolamento, seleção e avaliação da capacidade de síntese de celulose bacteriana e ácido acético, a partir de melaço de soja.

CAPÍTULO 1:

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Bactérias do Ácido Acético

O grupo de microrganismos capazes de oxidar o etanol a ácido acético é denominado de “bactérias do ácido acético - BAA” ou “bactérias acéticas”. Elas estão amplamente disseminadas na natureza e sua ocorrência em diversas regiões do mundo aponta para um grande potencial adaptativo desses microrganismos (STASIAK; BŁAŻEJAK, 2009). Elas desempenham um importante papel na produção de alimentos e bebidas, como vinagre e kombucha, mas podem ser deteriorantes em outros alimentos como vinho, cerveja e frutas. Também são utilizadas na produção de outros compostos como ácido glucônico, sorbose e celulose bacteriana (RASPOR; GORANOVIČ, 2008).

1.1.1. Taxonomia, Morfologia e Características

As bactérias do ácido acético pertencem à família *Acetobacteraceae* que inclui diversos gêneros e espécies. Atualmente elas estão classificadas em dezenove gêneros, os quais são: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Asaia*, *Neokomagataea*, *Granulibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Acidomonas*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea*, *Nguyenibacter*, *Swingsia*, *Commensalibacter*, *Endobacter* e *Bombella* (SAINZ et al., 2016).

As espécies pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (atualmente também denominado *Komagataeibacter*) são as principais responsáveis pela produção de vinagre devido à sua alta capacidade em oxidar o etanol a ácido acético bem como devido à alta resistência destes gêneros ao ácido acético liberado para o meio fermentativo (ADRÉS-BARRAO et al., 2013; NAKANO; FUKAYA, 2008). As espécies mais frequentemente relacionadas a mostos de vinagres são *Acetobacter aceti*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter oxydans*,

Gluconacetobacter entanii, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter oboediens* e *Komagataeibacter xylinus* (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2010b; TORIJA et al., 2010; YETIMAN; KESMEN, 2015). Estas bactérias são estritamente aeróbias, Gram-negativas, catalase positivas e possuem a forma de bastonetes, podendo ocorrer de forma única, em pares ou em cadeias. São também microrganismos mesófilos e seu crescimento ótimo está situado entre 25 e 30 °C. Oxidam etanol ou açúcar (glicose) a ácidos orgânicos correspondentes tais como ácido acético e ácido glucônico, na presença de oxigênio (SENGUN; KARABIYIKLI, 2011; ANDRÉS-BARRAO et al., 2012; WANG; SHAO; CHEN, 2015).

As espécies do gênero *Acetobacter* foram filogeneticamente divididas em dois grupos. O primeiro grupo correspondeu ao grupo *A. aceti*, que inclui *A. aceti*, *Acetobacter orleanensis*, *Acetobacter estunensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter cibirongensis*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter oenii*, *Acetobacter nitrogenifigens*, *Acetobacter cerevisiae* e *Acetobacter malorum*. O segundo grupo correspondeu ao grupo de *A. pasteurianus*, que incluiu *A. pasteurianus*, *Acetobacter lovaniensis*, *A. peroxydans*, *A. pomorum* e *Acetobacter syzygii*. Os dois grupos foram fenotipicamente discriminados entre si pela produção de 2-cetogluconato (exceto para *A. oenii*), produção de 5-cetogluconato, em que duas espécies, *A. aceti* e *A. oenii*, foram positivas, e a formação de dihidroxiacetona a partir de glicerol, que foi encontrada em três espécies, *A. aceti*, *A. pomorum* e *A. nitrogenifigens*. Em contraste, as espécies do grupo *A. pasteurianus* foram negativas em tais características fenotípicas (YAMADA; YUKPHAN, 2008).

As espécies do gênero *Gluconobacter* foram filogeneticamente divididas em dois grupos também. O primeiro grupo correspondeu ao grupo de *G. oxydans*, que inclui *G. oxydans* e *Gluconobacter albidus*. O segundo grupo correspondeu ao grupo *G. cerinus*, que inclui *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter frateurii* e *Gluconobacter thailandicus*. Estes dois grupos foram diferenciados fenotípica e geneticamente pelas características de crescimento em meios contendo D-arabitol e sem ácido nicotínico e pela composição do DNA. O crescimento do primeiro grupo nestes meios foi negativo, enquanto o crescimento do segundo foi positivo. Além disso, o maior conteúdo de bases G + C do DNA foi encontrado no primeiro grupo enquanto o menor foi encontrado no segundo grupo (YAMADA; YUKPHAN, 2008).

Há alguns anos, o gênero *Gluconacetobacter* foi também proposto ser subdividido em dois grupos com características morfológicas, fisiológicas e ecológicas diferentes: o grupo *Gluconacetobacter liquefaciens* e o grupo *Gluconacetobacter xylinus*. O primeiro grupo incluiu *Ga. liquefaciens*, *Ga. sacchari*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Gluconacetobacter azotocaptans*. O segundo grupo incluiu *Ga. xylinus*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus*, *Ga. entanii*, *Ga. oboediens*, *Ga. intermedius*, *Gluconacetobacter swingisii*, *Gluconacetobacter rhaeticus*, *Gluconacetobacter saccharivorans* e *Gluconacetobacter nataicola* (YAMADA; YUKPHAN, 2008). Em seguida, Yamada et al. (2012) propuseram o gênero *Komagataeibacter* para as espécies pertencentes ao grupo *Gluconacetobacter xylinus*. Conseqüentemente, o gênero *Gluconacetobacter* foi dividido em outros dois gêneros com base nas análises genéticas e nas características fenotípicas: o gênero *Gluconacetobacter*, para o grupo *Gluconacetobacter liquefaciens*, e um novo gênero, *Komagataeibacter*, para o grupo *Gluconacetobacter xylinus*. Os dois gêneros podem ser diferenciados pela produção de pigmentos marrons solúveis em água e motilidade celular. As espécies de *Gluconacetobacter* geralmente produzem pigmento marrom e são móveis, enquanto as espécies de *Komagataeibacter* não produzem o pigmento e não são móveis. Além disso, os habitats são diferentes entre os dois grupos. Enquanto as espécies do primeiro foram associadas a plantas e isoladas principalmente a partir de frutas, flores, café e cana-de-açúcar, as espécies deste último foram isoladas principalmente a partir de alimentos fermentados (KOMAGATA; IINO; YAMADA, 2014).

De acordo com Song et al. (2016), as espécies de bactérias encontradas nos meios fermentativos são significativamente afetadas pelas diferentes matérias-primas utilizadas e métodos de fermentação. Por exemplo, poucas espécies como *A. pasteurianus* foram identificadas a partir de vinagre de arroz, enquanto *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. malorum*, *K. xylinus*, *K. hansenii* e *K. europaeus* foram encontradas principalmente em vinagre balsâmico de média acidez. *A. pasteurianus* e *K. europaeus* foram encontradas ainda em vinagre de vinho. As técnicas moleculares permitiram observar também que ocorre uma sucessão de espécies durante a produção de vinagre, dependendo da concentração de ácido acético. Em baixas concentrações predominam as espécies do gênero *Acetobacter*, sendo a *A. pasteurianus* mais comum em vinagres de vinho enquanto outras como *A. malorum*, *A. cerevisiae* ou *A. aceti*, são frequentes em outros vinagres. Quando a

concentração de ácido acético excede 5%, as espécies do gênero *Komagataeibacter* assumem o processo, predominando espécies como a *K. europaeus* ou a *K. intermedius* (MAS et al., 2014).

Segundo Trček et al. (2016), as espécies *K. oboediens*, *K. intermedius* e *K. europaeus* são as principais representantes do processo de produção de vinagre com concentração de acidez acima de 6%, devido à resistência destes microrganismos a maiores concentrações de ácido acético. Esta última é descrita como uma das espécies mais frequentemente encontradas e isoladas a partir de fermentadores industriais submersos, por apresentar alta resistência ao ácido acético liberado (ANDRÉS-BARRAO et al., 2011). Esta adaptação a condições extremas de acidez é provavelmente devido a mutações no genoma destes microrganismos. Em contraste, as espécies do gênero *Acetobacter* são as principais responsáveis pela produção tradicional de vinagre, em que a acidez final normalmente não excede 8%, sendo estas danificadas quando tal concentração de ácido acético é atingida (ANDRÉS-BARRAO et al., 2016).

As BAA oxidam etanol a ácido acético através de duas reações sequenciais, catalisadas por duas enzimas localizadas na superfície externa da membrana citoplasmática. A primeira reação, que converte o etanol em acetaldeído, é catalisada pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH), e a segunda, que converte o acetaldeído formado para ácido acético, é catalisada pelas enzimas aldeído desidrogenase (ALDH) (YAKUSHI; MATSUSHITA, 2010; CHEN et al., 2016). O ácido acético produzido é liberado para o meio fermentativo, onde se acumula em um nível máximo entre 5 a 10%, no caso das espécies pertencentes ao gênero *Acetobacter* e entre 10 a 20% para as espécies do gênero *Komagataeibacter* (ANDRÉS-BARRAO et al., 2012; ANDRÉS-BARRAO et al., 2016). O gênero *Acetobacter* pode ainda oxidar o ácido acético produzido, gerando dióxido de carbono e água, o que resulta na chamada oxidação de acetato ou superoxidação. Essa característica é utilizada para diferenciação do gênero *Gluconobacter*, o qual não apresenta a mesma capacidade. Esse critério depende da composição do meio, só ocorrendo na ausência de etanol (RASPOR; GORANOVIĆ, 2008; GULLO; VERZELLONI; CANONICO, 2014).

Algumas espécies de bactérias do ácido acético também foram descritas como capazes de sintetizar outros metabólitos, tais como sorbose a partir de sorbitol, pelo gênero *Gluconobacter* (HATTORI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010),

dihidroxiacetona a partir de glicerol (STASIAK; BŁAŻEJAK, 2009) e celulose, um exopolissacarídeo secretado por espécies dos gêneros *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter* (CACICEDO et al., 2016).

A Tabela 1, a seguir, apresenta as principais características bioquímicas que diferenciam os principais grupos de BAA.

Tabela 1. Características diferenciais dos principais gêneros de BAA.

Característica	A.	G.	Ga.	K.
Motilidade e flagelação	Peritríquios ou não-móveis	Polar ou não-móveis	Peritríquios ou não-móveis	Nenhum
Oxidação de etanol a ácido acético	+	+	+	+
Oxidação de ácido acético a CO ₂ e H ₂ O	+	–	+	variável
Oxidação do lactato a CO ₂ e H ₂ O	+	–	variável	variável
Crescimento em meio contendo 0,35% de ácido acético	+	+	+	+
Produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol	variável	+	variável	variável
Produção de ácido a partir de:				
Glicerol	variável	+	+	n.i.
D-Manitol	variável	+	variável	–
Rafinose	–	–	–	n.i.
Produção de celulose	–	–	variável	variável

Fonte: Bartowsky; Henschke (2008); Sengun; Karabiyikli (2011); Yamada et al. (2012).

Abreviações: A = *Acetobacter*; G = *Gluconobacter*; Ga = *Gluconacetobacter*; K = *Komagataeibacter*.

+ = positivo.

– = negativo.

n.i. = não informado.

1.1.2. Isolamento e Identificação Fenotípica

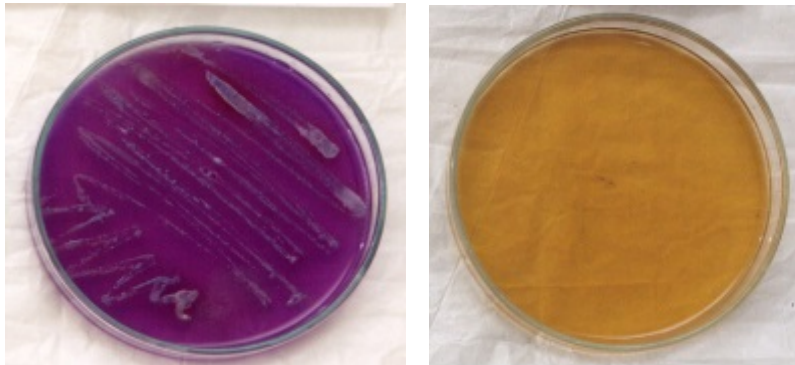
Bactérias do ácido acético são descritas como sendo microrganismos exigentes e difíceis de serem isoladas e cultivadas, apesar do grande número de meios de cultivo propostos. Essa dificuldade é algumas vezes atribuída ao fenômeno de estado viável mas não cultivável, onde a população é frequentemente subestimada pela incapacidade de se cultivá-las nos meios de crescimento, especialmente para aquelas isoladas de fontes com alta concentração de ácido acético. Nem todos os meios suportam igualmente o seu crescimento e alguns são

seletivos para uma linhagem ou outra. Assim, diferentes meios foram propostos para o isolamento e cultivo destes microrganismos e métodos fenotípicos baseados em habilidades fisiológicas são utilizados para sua identificação (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008; VEGAS et al. 2010; SENGUN; KARABIYIKLI, 2011). De acordo com Spinosa (2002), o isolamento e purificação de bactérias do ácido acético a partir de mostos industriais é realizado através da utilização de meios líquidos ou sólidos que atendam às necessidades nutricionais destes microrganismos. As fontes de carbono utilizadas são principalmente glicose e manitol, sendo frequentemente adicionados etanol e ácido acético, em concentrações variadas. Fontes de nitrogênio, como peptona e extrato de levedura, e de minerais como KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e MgSO_4 são também frequentemente adicionados para a recuperação dos microrganismos. A técnica da dupla camada em meio sólido proposta por Entani et al. (1985), contendo uma camada inferior com 0,5% em ágar e uma camada superior com 1,0% em ágar é a mais utilizada, pois fornece um ambiente suficientemente úmido para o cultivo dos microrganismos isolados a partir de caldos fermentativos de elevada acidez.

Após o seu isolamento, os gêneros podem ser determinados através de identificação fenotípica com uso de meios de diferenciação, que são baseados nas características bioquímicas destes microrganismos, tais como oxidação de etanol, oxidação de lactato, oxidação de acetato, produção de ácido a partir de glicose, produção de celulose, entre outros (SPINOSA, 2002).

O gênero *Acetobacter* pode ser rapidamente diferenciado do gênero *Gluconobacter* pela capacidade de oxidação de lactato desses microrganismos. O meio Dextrose Sorbitol Manitol (DSM) contém lactato de cálcio como principal fonte de carbono e quantidades menores das outras fontes. Conforme mostrado na Figura 1, quando *Acetobacter* cresce no meio DSM, há uma mudança da cor do meio de amarelo para púrpura devido ao consumo do lactato, causando uma mudança do pH que é detectada pelo uso do indicador púrpura de bromocresol. *Gluconobacter*, incapaz de oxidar o lactato, oxida preferencialmente os carboidratos presentes em menores quantidades, produzindo ácido e mantendo a cor amarela do meio (CIRIGLIANO, 1982; SPINOSA, 2002).

Figura 1. Linhagens de bactérias *Acetobacter Aceti* (esquerda) e *Gluconobacter oxydans* (direita) após crescimento em ágar DSM.



Fonte: Spinosa (2002).

A oxidação de etanol para ácido acético, no caso de *Gluconobacter*, e a superoxidação, que gera CO_2 e H_2O a partir do ácido acético, no caso dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*, também pode ser detectado através de meios de diferenciação. No meio de Carr (FUGELSANG; EDWARDS, 2007), por exemplo, a única fonte de carbono é o etanol e utiliza-se o indicador verde de bromocresol para acompanhar a mudança de pH. Após a oxidação do etanol, a cor do meio passa de verde para amarelo, indicando a formação de ácido pela diminuição do pH. As *Acetobacter* sp. continuam a oxidação do ácido gerado, aumentando o pH do meio e retornando a cor verde inicial. *Gluconobacter* sp., incapaz de oxidar acetato, mantém o pH ácido e a cor meio se mantém amarela.

Outro meio relatado para evidenciar a oxidação do etanol utiliza CaCO_3 . O ácido acético que é inicialmente formado dissolve o carbonato de cálcio ocasionando a formação de zonas claras ao redor das colônias. Em seguida, a continuação da oxidação do ácido acético pelo gênero *Acetobacter* gradualmente leva ao desaparecimento das zonas claras em função da precipitação do carbonato de cálcio (SIEVERS; SWINGS, 2005). Esse princípio também é utilizado como prova bioquímica da produção de ácido a partir de glicose, substituindo a fonte de carbono etanol, por glicose, no meio sólido contendo CaCO_3 (SPINOSA, 2002).

O glicerol é um componente importante do vinho, formado durante a fermentação alcoólica. *G. oxydans* e *A. aceti* podem metabolizar oxidativamente o glicerol em dihidroxiacetona (denominado de cetogênese) sendo esta metabolização

também frequentemente utilizada como um teste bioquímico para identificação fenotípica (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008).

Os principais meios relatados para isolamento, cultivo e diferenciação destas bactérias são apresentados na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Principais meios utilizados para isolamento, cultivo e diferenciação de BAA.

Meio	Composição (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)	Fonte
AE (Acetic acid-Ethanol)	Glicose (5); Extrato de Levedura (3); Peptona (4); Ácido acético (30); Etanol (30); Ágar (9)	Gullo et al. (2006)
BME (Basal Medium plus Ethanol)	Extrato de levedura (0,5); Hidrolisado de caseína (3); Etanol (3); Ágar (15)	Cleenwerck et al. (2007)
Carr	Extrato de Levedura (30); Etanol (20); Verde de Bromocresol (0,022); Ágar (20)	Fugelsang; Edwards (1997)
CaCO₃-Medium	Glicose (0,5); Extrato de Levedura (5); Peptona (3); Carbonato de cálcio (15); Etanol (15); Ágar (12)	Sievers; Swings (2005)
DSM (Dextrose-Sorbitol-Mannitol)	Glicose (1); Sorbitol (1); Manitol (2); Extrato de Levedura (3,3); Proteose Peptona (10); Lactato de Cálcio (15); KH ₂ PO ₄ (1); MnSO ₄ ·H ₂ O (0,02); Cicloheximida (0,004); Púrpura de Bromocresol (0,03); Verde Brilhante (0,29 µg); Ágar (15)	Cirigliano (1982)
GY (Glucose-Yeast extract)	Glicose (50); Extrato de levedura (10); Ágar (15)	Cleenwerck et al. (2009)
GYAE (Glucose-Yeast extract-Acetic acid-Ethanol)	Glicose (50); Extrato de levedura (10); Ácido acético (10); Etanol (20); Ágar (15)	Cleenwerck et al. (2009)
GYC (Glucose-Yeast extract-CaCO ₃)	Glicose (100); Extrato de levedura (10); Carbonato de cálcio (20); Ágar (15)	Gullo et al. (2006)
GYEC (Glucose-Yeast extract-Ethanol-CaCO ₃)	Glicose (10); Extrato de levedura (10); Carbonato de cálcio (20); Etanol (30); Ágar (10)	Wu et al. (2012)
GYP (Glucose-Yeast extract-Peptone)	Glicose (30); Extrato de levedura (5); Peptona (2); Ágar (15)	Entani et al. (1985)
MYA (Malt extract-Yeast extract-Ágar)	Extrato de malte (15); Extrato de levedura (5); Etanol (60); Ágar (15)	Gullo; Giudici (2008)
MYP (Mannitol-Yeast extract-Peptone)	Manitol (25); Extrato de levedura (5); Peptona (3); Ágar (12)	Gullo; Giudici (2008)
RAE (Reinforced AE)	Glicose (40); Extrato de levedura (10); Peptona (10); Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (3,38); Ácido cítrico (1,5); Ácido acético (10); Etanol (20); Ágar (10)	Sokollek; Hammes (1997)
SYP (Sorbitol-Yeast extract-Peptone)	Sorbitol (50); Extrato de Levedura (5); Peptona (3); Ágar (12)	Sievers; Swings (2005)
YG (Yeast extract-Glucose)	Glicose (20); Extrato de levedura (5); (NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,26); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,05)	Ohmori et al. (1980)
YGM (Yeast extract-Glucose- Mannitol)	Glicose (20); Manitol (20); Extrato de levedura (10); Ácido acético (5); Etanol (20)	Ohmori et al. (1980)
YPE (Yeast extract-Peptone-Ethanol)	Extrato de levedura (10); Peptona (5); Etanol (20); Ágar (15)	Fugelsang; Edwards (1997)

Fonte: Spinosa (2002); Martins (2012). Adaptado.

A produção de celulose pelos gêneros *Komagataeibacter* e *Gluconacetobacter* pode ser detectada pela formação de uma película gelatinosa produzida sobre a superfície de meios líquidos, quando cultivadas em condições estáticas, ou pelo surgimento de massas esféricas e/ou irregulares, de até 10 mm de tamanho, sob cultivo em condições agitadas. Os principais meios sintéticos relatados para produção de celulose são mostrados na Tabela 3. As principais fontes de carbono utilizadas são glicose, sacarose e frutose, sendo suplementados com fontes de nitrogênio, minerais e etanol em alguns casos (SCHRAMM; HESTRIN, 1954; GU; CATCHMARKA, 2012).

Tabela 3. Principais meios sintéticos utilizados para produção de celulose.

Meio	Composição (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)	Fonte
Barud-Medium	Glicose (50); Extrato de Levedura (4); Na ₂ HPO ₄ (2); MgSO ₄ •7H ₂ O (0,8); Etanol (20)	Barud et al. (2015)
BM (Basal Medium)	Glicose (50); Extrato de Levedura (5); Peptona (5); Na ₂ HPO ₄ (2); K ₂ HPO ₄ (1); MgSO ₄ (0,25); Ácido cítrico (1)	Li et al. (2012)
Glucose-Medium	Glicose (20); Extrato de Levedura (5); K ₂ HPO ₄ (1); MgSO ₄ (15); Etanol (20)	Ge et al. (2011) apud Lin et al. (2015)
HS (Hestrin-Schramm)	Glicose (20); Extrato de Levedura (5); Peptona (5); Na ₂ HPO ₄ (2,7); Ácido cítrico (1,15)	Hestrin; Schramm (1954)
M1A05P5-medium	Glicose (10); Extrato de Levedura (10); Peptona (7); Ácido acético (1,5); Etanol (10)	Çakar et al. (2014) apud Aytekin; Demirbağ; Bayrakdar (2016)
Maneerung-medium	Glicose (100); Extrato de Levedura (10)	Maneerung; Tokura; Rujiravanit (2008)
Mohite-Medium	Sacarose (28,1); KNO ₃ (5); Na ₂ HPO ₄ (0,1); CaCl ₂ (12,6); MgSO ₄ (1)	Mohite et al. (2012) apud Mohite; Patil (2014)
Park-medium	Glicose (10); Extrato de Levedura (10); Peptona (7); Ácido acético (1,5); Succinato (0,2)	Park; Jung; Park (2003)
Tang-medium	Glicose (25); Extrato de Levedura (10); Peptona (7,5); Na ₂ HPO ₄ (10); Ácido acético (10)	Tang et al. (2010)
Yamanaka-medium	Glicose (50); Extrato de Levedura (5); (NH ₄) ₂ SO ₄ (5); KH ₂ PO ₄ (3); MgSO ₄ •7H ₂ O (0,05)	Yamanaka et al. (1989)
Zeng-medium	Frutose (20); Extrato de Levedura (20); (NH ₄) ₂ SO ₄ (3,3); KH ₂ PO ₄ (1); MgSO ₄ •7H ₂ O (0,122)	Zeng et al. (2011a)
Zhou-medium	Glicose (18); Sacarose (21); Milhocina (20); (NH ₄) ₂ SO ₄ (4); KH ₂ PO ₄ (2); MgSO ₄ •7H ₂ O (0,4)	Zhou et al. (2007)

1.1.3. Identificação Molecular

Além das técnicas tradicionais de identificação de gêneros, que incluem testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, nos últimos anos, uma variedade de métodos baseados em técnicas moleculares de extração de DNA e identificação por Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), têm sido utilizados para identificação e diferenciação dos gêneros, espécies e linhagens de bactérias do ácido acético. Entre eles, os principais métodos relatados foram: perfil plasmidial; amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA por PCR; RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dos genes 16S–23S rRNA amplificados por PCR; AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) do gene 16S rRNA parcialmente amplificado por PCR; REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*); *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR), Hibridização DNA-DNA e 16S e ITS-ARDRA (*Intergenic Transcribed Spacer-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (MARTINS, 2012; TRČEK; BARJA, 2015). Estas técnicas apresentam diferenças no tempo de execução e instrumentos utilizados bem como na capacidade de discriminação. Por exemplo, nos trabalhos relatados, enquanto os métodos DGGE-PCR e RFLP-PCR permitiram a identificação de gêneros (RUIZ et al., 2000; DE VERO; GIUDICI, 2008), os métodos ERIC-PCR, PCR da região do gene 16S rRNA e a análise do perfil plasmidial possibilitaram a identificação de espécies (SIEVERS et al., 1998; TEUBER; SIEVERS; ANDRESEN, 1987; FRANKE-WHITTLE et al., 2005; WU et al., 2010).

Outra abordagem mais recente descreve o uso, com sucesso, do perfil de proteínas obtidas por MALDI-TOF MS (do inglês "*Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*") de bactérias intactas, para diferenciação dos diferentes gêneros, espécies e linhagens da mesma espécie. O instrumento MALDI-TOF MS apresenta três componentes principais: uma câmara de ionização onde ocorre a vaporização da amostra, um analisador de tempo de voo que separa os íons de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e um detector de partículas para monitorizar os íons separados. O espectro de massa resultante é composto de 10 a 30 picos que correspondem a proteínas solúveis de alta abundância, sendo único para cada bactéria. A partir da correspondência do espectro gerado pela amostra com um espectro disponível em um banco de dados

de espectros de linhagens de referência, realiza-se a identificação da bactéria desconhecida. O MALDI-TOF MS é descrito como uma ferramenta rápida e adequada para diferenciação e identificação de bactérias associadas à produção de vinagre e permite que os microrganismos sejam distinguidos em nível de espécie ou mesmo subespécies. Porém, ainda é necessária a criação de mais espectros para as espécies mais frequentemente encontradas e a integração desses espectros na base de dados, para permitir uma diferenciação inequívoca das bactérias desconhecidas (ADRÉS-BARRAO et al., 2013; TRČEK; BARJA, 2015).

1.1.4. Métodos de Contagem

A dificuldade na determinação da população total de bactérias do ácido acético é relatada na literatura e atribuída a diversos fatores, entre eles, ao fenômeno de estado viável, mas não cultivável, onde a população é frequentemente subestimada pela incapacidade de cultivo em meios de crescimento; ao arranjo das bactérias, uma vez que elas podem ocorrer em pares, cadeias ou agregados, o que pode representar uma única colônia quando plaqueadas em meio sólido; e ao biofilme formado na superfície das placas de Petri, quando as bactérias crescem, o que impede a formação de colônias e a subsequente contagem (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008; FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2010b; VEGAS et al., 2010). Essa limitação foi observada por Spinosa (2002) ao tentar determinar a população de BAA a partir de fermentadores industriais. O número de bactérias viáveis foi obtido através do método de contagem direta em microscópio óptico, utilizando a câmara de Neubauer e o corante vital azul de *trypan* 0,2% como um diferenciador da viabilidade celular.

Outro método relatado para enumeração de BAA viáveis, mas não cultiváveis foi realizado utilizando a técnica da PCR em tempo real (RT-PCR em inglês "*Real-time PCR*"), sendo esta descrita como uma ferramenta rápida, sensível e precisa. No trabalho de González et al. (2006), a RT-PCR mostrou-se adequada para a enumeração destas bactérias em amostras de vinagres e vinhos artificialmente contaminados. Foi possível a quantificação de bactérias acéticas mesmo em amostras contaminadas com outros microrganismos, como leveduras, sem inibição causada pela presença destas. A RT-PCR também foi utilizada por Torija et al. (2010), empregando sonda TaqMan e *primers* específicos para detecção e

enumeração de cinco espécies de BAA em amostras de vinho e vinagre. Em outro método desenvolvido, descrito por Mesa et al. (2003) e Baena-Ruano et al. (2006), foi utilizada a coloração de epifluorescência para a enumeração de bactérias totais, viáveis e não viáveis durante a produção de vinagre. A técnica consiste no uso de uma mistura apropriada de dois corantes fluorescentes que diferem nas suas características espectrais bem como na sua capacidade de penetrar em células bacterianas saudáveis. As bactérias com membrana citoplasmática intacta tingem-se de verde fluorescente, enquanto que as bactérias com membranas danificadas tingem-se de vermelho fluorescente. A leitura é realizada em microscópio equipado com lâmpada de mercúrio e filtros apropriados para o método empregado.

1.1.5. Produtos do Metabolismo de Bactérias do Ácido Acético

1.1.5.1. Vinagre e Ácido Acético

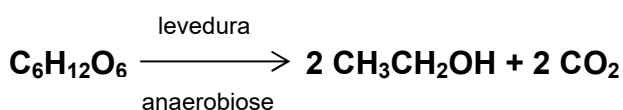
O vinagre é uma solução aquosa de ácido acético presente em concentração entre 4% a 12%, conhecido e consumido no mundo todo como condimento alimentar e conservante (BRASIL, 2012; CHEN et al., 2013a; BUNICK et al., 2012; WU et al., 2012).

Este produto é geralmente obtido através da fermentação de fontes de carboidratos, como glicose ou amido hidrolisado, num processo dividido em duas etapas principais: primeiramente ocorre uma fermentação anaeróbica, conduzida por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* que produzem etanol (Reação 1), seguido por uma oxidação do etanol gerado, realizada por bactérias que convertem o etanol a ácido acético (Reação 2). Matérias-primas constituídas de amido ou carboidratos complexos necessitam ainda de sacarificação anterior à fermentação alcoólica, para liberação de açúcares fermentescíveis. As principais matérias-primas utilizadas para produção do vinagre são as bebidas derivadas da fermentação alcoólica de frutas, como vinho e sidra, cereais, como arroz, e o mel (RASPOR; GORANOVIČ, 2008; DU et al., 2011; UYSAL et al., 2013; YETIMAN; KESMEN, 2015). O vinagre de álcool ou vinagre “branco” é originado a partir da fermentação acética de soluções hidroalcoólicas diluídas e, segundo Mas et al. (2014), este é o vinagre mais produzido mundialmente.

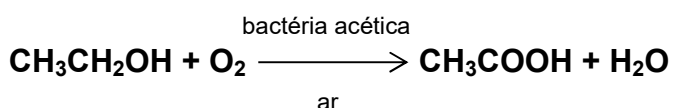
O uso do vinagre é datado há mais de 10000 anos. Conhecido pela maioria das antigas civilizações, já era utilizado medicinalmente há séculos, como agente antisséptico para o tratamento de feridas e lavagem das mãos. Hoje, comumente empregado como um ingrediente em conservas de frutas e vegetais e em preparo de molhos para saladas, o vinagre se tornou reconhecido por suas propriedades funcionais, tais como: atividades antibacteriana e antioxidante, redução da pressão arterial, regulação da glicose sanguínea e prevenção de doenças cardiovasculares, conforme relatados na literatura. Tais propriedades funcionais estão possivelmente relacionadas às substâncias bioativas presentes nos vinagres, como por exemplo, os polifenóis (XAVIER et al., 2011; MARQUES et al., 2010; VANIN et al., 2012; BUDAK et al., 2014).

Figura 2. Reações químicas ocorridas nas etapas de fermentação alcoólica e acética para obtenção do vinagre.

1ª Reação (Fermentação alcóolica):



2ª Reação (Oxidação):



Apesar de ser derivado de um processo espontâneo que ocorre em vinhos e mostos em contato com o ar, o grande consumo medicinal e alimentício do vinagre tornou necessária a elaboração de processos tecnológicos visando à obtenção comercial do produto. Atualmente, os métodos tradicional (lento), submerso e rápido são os principais processos relatados para a produção de vinagre (SPINOSA, 1996; VEGAS et al., 2010; VALERA et al., 2015; YETIMAN; KESMEN, 2015).

1.1.5.1.1. Método Tradicional ou Lento

No método tradicional de produção de vinagre, também conhecido como processo lento ou método Orleans, as bactérias crescem na superfície do líquido durante a fermentação, mantendo contato direto com o oxigênio do ar atmosférico. Para que isso ocorra, barricas de madeira são preenchidas em até 2/3 da capacidade total, deixando uma câmara de ar que é mantida em contato com o ar externo através de orifícios. A versão mais atual deste processo inclui, além de furos laterais para uma melhor circulação de ar, também um funil levado até a base do barril pelo qual o vinho pode ser adicionado na parte inferior, sem alterar o polímero formado na superfície do líquido pelas bactérias, denominado de “zoogleia” ou “mãe do vinagre” (VEGAS et al., 2010; MAS et al., 2014; YETIMEN; KESMAN, 2015).

O método tradicional de produção pode levar de algumas semanas a alguns meses ou até que o grau de ácido acético seja suficientemente alcançado. O fato de o processo ser lento permite não só a acetificação e o envelhecimento do produto, mas também a produção de metabólitos secundários pelas bactérias, o que aumenta a complexidade sensorial do vinagre obtido. Este fato faz com que os vinagres produzidos pelo método tradicional sejam considerados de alta qualidade (VEGAS et al., 2010; MAS et al., 2014; YETIMAN; KESMEN, 2015).

1.1.5.1.2. Método Rápido

Nesse método de produção é utilizado um gerador, sob a forma de um tanque cilíndrico, dividido em três partes: seção superior, seção maior ou do meio e seção inferior. A seção mediana é preenchida com aparas de madeira, sabugo de milho, bagaço de cana ou outro material propício à formação de grande área de exposição. O líquido a passar pelo processo de avinagramento é colocado na parte superior, por meio de um alimentador, e então é transferido à parte central, por meio de um pulverizador. Na seção mediana, por gotejamento, o líquido se depara com um filme de bactérias, desenvolvido no material de suporte, onde ocorre a oxidação do álcool a ácido acético. Da parte central, novamente por gotejamento, o líquido passa para a parte inferior, de onde é coletado. Essa mistura em acetificação pode circular pelo gerador, por bombeamento, quantas vezes forem necessárias, até a completa oxidação do etanol a ácido acético. Antes de entrar em atividade, um novo gerador recebe o vinagre, contendo as bactérias acetificantes, em sua parte mediana. Estas serão responsáveis pela inoculação dos microrganismos desejados no material de

suporte. O método rápido originou-se a partir da observação da importância da aeração no processo lento. O ar entra no gerador por meio de orifícios situados no fundo falso da seção mediana. Ao ser aquecido, esse ar sobe e é aspirado por cima (SPINOSA, 1996; ZANCANARO JUNIOR, 2001; RASPOR; GORANOVIČ, 2008).

1.1.5.1.3. Método Submerso

Neste método, as bactérias estão submersas no líquido a ser acetificado, devendo a circulação de ar no interior do tanque ser mantida de forma adequada e contínua durante todo o processo, de modo a fornecer o oxigênio necessário para a fermentação ocorrer. O termo “fermentação submersa” remete aos métodos de produção de antibióticos e de cultivo de leveduras, nos quais os microrganismos estão sempre submersos no líquido em fermentação, onde se multiplicam e realizam a conversão dos substratos em produtos. Por este método, o vinagre é produzido num curto intervalo de tempo (entre 24 a 48 horas) e sua qualidade sensorial é inferior ao vinagre obtido pelo método tradicional. Geralmente, o processo submerso é utilizado para produção industrial de vinagres comerciais em função de sua alta eficiência e produtividade (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2010a; VEGAS et al., 2010; SPINOSA et al., 2015).

1.1.5.2. Kombucha

O Kombucha é uma tradicional bebida obtida pela fermentação de chá açucarado com uma culturamista de leveduras e bactérias do ácido acético, que formam uma película celulósica denominada “fungo do chá”. As leveduras fermentam o açúcar presente para etanol, que é oxidado para ácido acético pelas bactérias. As principais BAA encontradas no Kombucha foram *K. xylinus*, *A. aceti*, *A. pasteurianus* e *G. oxydans*. Diversos gêneros de leveduras foram também identificados tais como *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (MARSH et al., 2014; NGUYEN et al., 2015; AYED; ABID; HAMD, 2017). É relatado que a bebida Kombucha possui uma série de propriedades, como melhora da saúde, aumento da longevidade e melhora de distúrbios gastrointestinais. Tais propriedades benéficas são atribuídas principalmente à sua

composição. As análises químicas do Kombucha mostraram a presença de vários ácidos orgânicos, tais como ácido acético, glucônico, glucurônico, cítrico, láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico e pirúvico, além de outros nutrientes como açúcares, vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos, provenientes do substrato fermentativo. Estes compostos fenólicos agem como antioxidantes no corpo eliminando radicais livres nocivos envolvidos em doenças degenerativas. Os chás preto e verde são os substratos mais usados para preparação do Kombucha, mas a busca por outras fontes ricas em antioxidantes levou também ao uso de sucos de frutas, que contêm mais vitaminas e nutrientes para o corpo humano (JAYABALAN et al., 2014; AYED; ABID; HAMDI, 2017).

1.1.5.3. Ácido Glucônico

O ácido glucônico ($C_6H_{12}O_7$) é um ácido orgânico componente natural de frutas, plantas, vinho e mel. Fornece um sabor ácido refrescante aos produtos, podendo ser utilizado como um aditivo na indústria de alimentos. Pode ser produzido quimicamente ou por processos enzimáticos, porém, o método mais comum para a sua síntese é a fermentação oxidativa. A variedade de bactérias capazes de metabolizar glicose para ácido glucônico inclui vários gêneros de BAA e outros gêneros, como *Pseudomonas* e *Zymomonas* (CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016).

O ácido glucônico pode ser sintetizado por bactérias acéticas por duas vias diferentes. Na primeira via, a D-glicose é diretamente oxidada pela glucose-desidrogenase (GDH) ligada à membrana externa. Na segunda via, a glicose é primeiramente levada para dentro das células e depois convertida em D-gluconato, por oxidação via pentose fosfato catalisada pela glucose-desidrogenase intracelular. Porém, a produção de ácido D-glucônico é principalmente resultado da oxidação direta no espaço periplásmico, uma vez que a atividade da GDH ligada à membrana é 30 vezes maior do que a do GDH citosólica (SAINZ et al., 2016).

O ácido glucônico foi proposto ser um parâmetro de qualidade de produtos porque contribui para o perfil aromático dos alimentos. Consequentemente, é preferível o uso de bactérias que produzem simultaneamente ácido glucônico e ácido acético durante a fermentação, quando a qualidade sensorial do produto final é esperada (MOUNIR et al., 2016).

O uso do ácido glucônico também é relatado na indústria farmacêutica, sob a forma de gluconatos de metais divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} , servindo como suplementos minerais para tratar hipocalcemia, hipomagnesemia e anemia, respectivamente. Finalmente, ácido glucônico é utilizado como substrato para a produção de derivados como 2-ceto-D-gluconato (2-KGA) e 5-ceto-D-gluconato (5-KGA), através da oxidação regioseletiva pelas desidrogenases de algumas bactérias do ácido acético, como *G. oxydans*. 2-KGA pode ser usado para síntese química de outros compostos, como o ácido isoascorbico ou de heterociclos, enquanto o 5-KGA é útil na produção de ácido tartárico, um antioxidante da indústria de alimentos, bem como para a produção de vitamina C através do método Gray (CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016).

1.1.5.4. Sorbose e Ácido Ascórbico

Bactérias do ácido acético, particularmente as do gênero *Gluconobacter*, podem ser usadas para conversão oxidativa de sorbitol a sorbose, um intermediário importante na produção do ácido L-ascórbico (vitamina C). Duas enzimas ligadas à membrana desempenham papel na produção microbológica de L-sorbose a partir de D-sorbitol. Uma é a glicerol desidrogenase (GLDH), que oxida álcoois de açúcar, como, por exemplo, glicerol a dihidroxiacetona, D-manitol a D-frutose e D-arabitol a D-xilulose. A outra enzima oxidante é a sorbitol desidrogenase (SLDH), que catalisa a oxidação regioseletiva de D-sorbitol (OLIVEIRA et al., 2010; HATTORI et al., 2012). O ácido L-ascórbico (Vitamina C) tem papel importante na alimentação humana e animal e pode ser utilizado como um antioxidante na indústria de alimentos para fins de conservação. Ele ainda é comercialmente sintetizado através do processo Reichstein-Grüssner, constituído de sete etapas, utilizando D-glucose como substrato de partida. Esse processo envolve seis etapas químicas e uma etapa de fermentação, que é a oxidação de D-sorbitol em L-sorbose. Esta etapa bioquímica é catalisada pela sorbitol desidrogenase de *G. oxydans*, uma vez que a oxidação química do sorbitol resultaria na racemização da L-sorbose e reduziria o rendimento pela metade. Tal fato demonstra a importância da biotransformação estereoespecífica de D-sorbitol para L-sorbose catalisada por *G. oxydans* (DEPPENMEIER; HOFFMEISTER; PRUST, 2002; MUYNCK et al., 2007).

1.1.5.5. Cacau

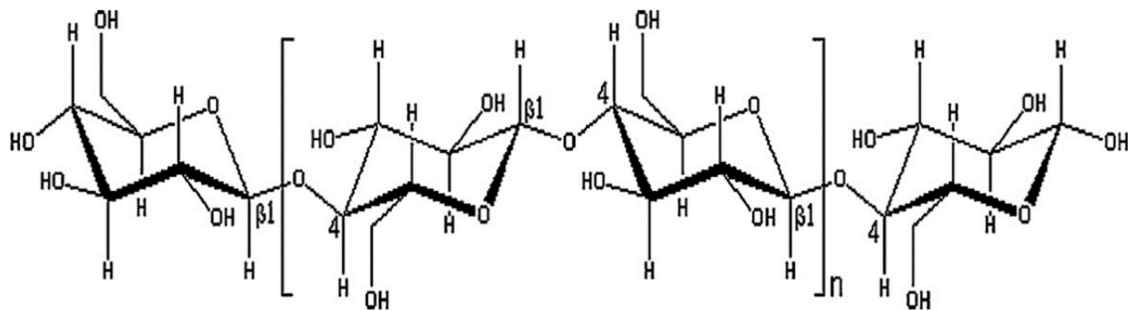
A popularidade do cacau, matéria-prima para a fabricação de chocolate, não está relacionada ao seu valor nutritivo, mas sim ao seu sabor, cor e aroma. Para obter essas propriedades sensoriais, o cacau deve passar pelo processo de fermentação para resultar no sabor, aroma e cor desejados. O cacau é, portanto, classificado na categoria de alimentos cujo sabor característico é desenvolvido através de um bioprocessamento, necessitando de fermentação microbiana para o desenvolvimento do seu sabor. A principal razão para esta fermentação é induzir a transformação bioquímica dentro dos frutos que leva à formação da cor, do aroma e do sabor do cacau. O bioprocessamento é espontâneo e, portanto, as espécies microbianas presentes diferem entre lotes e diferentes localizações geográficas. Ocasionalmente, uma fermentação mais controlada é necessária, e culturas iniciadoras são utilizadas. Os principais microrganismos identificados na fermentação foram leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Os eventos que ocorrem durante a fermentação correspondem a uma sucessão de microrganismos que metabolizam a polpa. Ao iniciar a fermentação, o baixo pH e o alto teor de açúcar da polpa permitem a fermentação por leveduras e bactérias lácticas. À medida que os microrganismos fermentam os açúcares, produzem calor e elevam a temperatura. À medida que a temperatura sobe e o álcool se acumula, a proporção de leveduras cai, predominando as BAA, cujo crescimento é favorecido também pela presença de oxigênio e ao baixo pH. As espécies de BAA predominantemente identificadas foram *A. lovaniensis*, na produção de cacau na República Dominicana e *Acetobacter syzygii*, *A. pasterianus* e *A. tropicalis*, no caso da produção de cacau de Gana. Presença de *Gluconobacter* spp. e *Acetobacter ghanensis* também foram relatadas. Os metabolitos mais importantes produzidos são os ácidos acético e láctico que são os responsáveis pelo sabor ácido (RASPOR; GORANOVIČ, 2008; KOMAGATA; IINO; YAMADA, 2014).

Uma vez que a produção e a exportação de cacau representam uma parte significativa da renda de alguns países, melhorias do bioprocessamento de produção e o aumento da eficiência do metabolismo são de grande importância e interesse para pesquisas (RASPOR; GORANOVIČ, 2008).

1.1.5.6. Celulose

A celulose é um homopolímero linear, insolúvel em água e constituído de unidades repetidas de β -D-glicose ($C_6H_{10}O_6$)_n alternadamente giradas em 180°, unidas por ligações glicosídicas (1→4) (Figura 3) (MATTHEWS et al., 2011; GIBSON, 2012).

Figura 3. Estrutura da celulose.



Fonte: Sheykhnazari et al. (2011).

A celulose é um polímero sintetizado por muitos organismos diferentes, incluindo plantas, algas e algumas bactérias. A produção microbiológica tem atraído interesse nos últimos anos devido às propriedades e características incomuns da celulose obtida. Essa produção se dá sob a forma de uma película extracelular, que rapidamente se agrega em microfibrilas celulósicas. Diferentemente da celulose sintetizada por plantas, a qual é normalmente encontrada misturada com lignina e hemicelulose, a celulose obtida a partir de bactérias apresenta propriedades físico-químicas e mecânicas superiores à da celulose vegetal, tais como: maior grau de pureza e índice de cristalinidade, maior grau de polimerização, melhor capacidade de absorção e retenção de água, maior resistência à tração, maior elasticidade e biocompatibilidade, além de não apresentar toxicidade (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; KUO et al., 2016; LIN et al., 2016).

Embora possua a mesma fórmula química que a celulose vegetal, a celulose produzida por bactérias é descrita como uma fibra fina, de dimensões nanométricas, cujo tamanho, pureza e cristalinidade dão a esta fibra propriedades distintas. Ela fornece uma textura muito mais suave às formulações de alimentos, nos quais o conteúdo em gordura foi substancialmente reduzido. Além disso, é relatado que a

celulose bacteriana possui poder espessante a baixas concentrações, é um agente estabilizante para conservação da umidade durante o armazenamento, é agente gelificante, sendo utilizada como melhorador de textura e firmeza de alimentos e fornece estabilidade ao aquecimento após a esterilização por calor (DONINI et al., 2010; SHI et al., 2014). A produção de celulose por bactérias é considerada uma área promissora devido à crescente necessidade de celulose pura e cristalina. Na indústria medicinal a celulose bacteriana tem uma importante aplicação, sendo utilizada como um regenerador de tecidos e funcionando como pele artificial temporária, aplicada sobre queimaduras e úlceras (DONINI et al., 2010).

O produto alimentício denominado de Nata de coco é obtido pela produção de celulose bacteriana a partir de água de coco ou leite de coco, adicionado de sacarose, di-hidrogenofosfato de amônio e inóculo, sendo consumido principalmente nas Filipinas, Tailândia, Indonésia e outros países do Sudeste Asiático. Após a fermentação a 28-31°C, durante 12 a 15 dias, forma-se uma camada de 5 a 7 cm de espessura de celulose. Lavando-a com água e removendo o ácido acético, o filme é cortado em cubos e servido como uma sobremesa. A análise do sequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que *K. xylinus* e *K. hansenii* são as principais responsáveis produção de Nata de coco. Além delas, *A. pasteurianus*, *A. orleanensis*, *A. lovaniensis*, *G. oxydans* e *G. frateurii* também foram identificadas no processo de produção (KOMAGATA; IINO; YAMADA, 2014).

De acordo com Kuo et al. (2016), a celulose bacteriana é excretada por várias espécies de bactérias incluindo *Komagataeibacter* (anteriormente *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella*. Porém, na maior parte dos estudos direcionados à produção de celulose bacteriana, utiliza-se a *Komagataeibacter xylinus* devido à sua maior capacidade em produzir celulose, em comparação com outras espécies, a partir de uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio, o que tornou esta espécie um sistema modelo para o estudo da biogênese da celulose e também devido à sua aplicabilidade na biossíntese industrial. No entanto, ainda é difícil obter uma produtividade elevada num sistema de fermentação em grande escala devido ao seu baixo rendimento em condições agitadas. Mais pesquisas são necessárias a fim de desenvolver métodos para produzir celulose bacteriana com maior rendimento e o menor custo possível (STASIAK; BŁAŻEJAK, 2009; MAMLOUK; GULLO, 2013; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; VALERA et al., 2015).

Além da *Komagataeibacter xylinus*, outras espécies de BAA associadas à produção de vinagre foram relatadas para obtenção de celulose. Entre elas, pesquisas utilizando *K. hansenii* (LI et al., 2012; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012; RANI; APPAIAH, 2013; UL-ISLAM et al., 2013; LIN et al., 2014; MOHITE; PATIL, 2014), *G. entanii* (BI et al., 2014), *K. intermedius* (KOSE et al., 2013; YANG et al., 2013a), *K. europaeus* (ZENG; LAROMAINE; ROIG, 2014), *Gluconacetobacter sacchari* (CARREIRA et al., 2011; TROVATTI et al., 2011; GOMES et al., 2013), *Komagataeibacter sucrofermentans* (SANTOS et al., 2015), *Gluconacetobacter medellensis* (CASTRO et al., 2012) e *A. acetii* (DAYAL et al., 2013) foram relatadas.

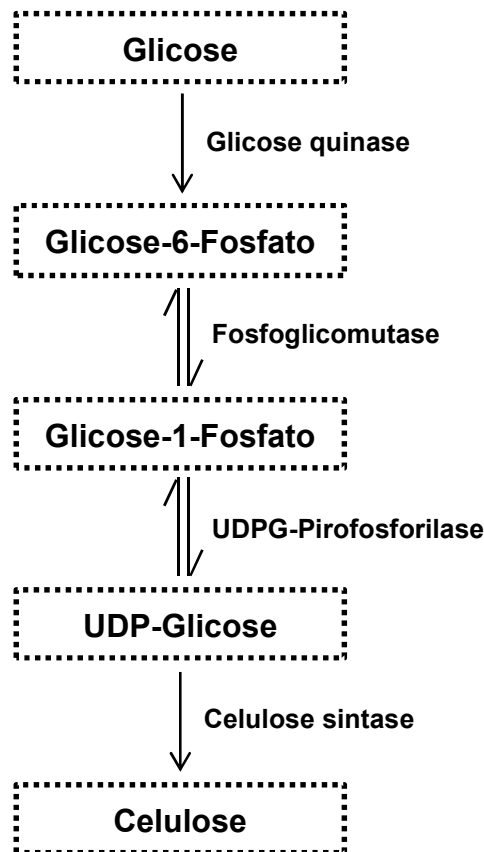
Durante a fermentação para a produção de vinagre, a formação de celulose é evidenciada pelo surgimento de uma manta gelatinosa formada na superfície do caldo de fermentação. Para a bactéria, essa película funciona como um mecanismo de flotação que permite ao microrganismo permanecer na interface ar/líquido, obtendo oxigênio com maior facilidade para seu crescimento e ainda atua como uma barreira física que auxilia na proteção das células contra a radiação ultravioleta. A película de celulose também aumenta a capacidade de colonizar substratos e seu caráter higroscópico permite a retenção de umidade prevenindo a desidratação do substrato (DONINI et al., 2010).

A síntese de celulose por microrganismos envolve três etapas principais. A primeira etapa refere-se à polimerização de glicose em cadeias de β -(1 \rightarrow 4)-glucana, a partir da glicose transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria. A segunda etapa envolve a secreção extracelular das cadeias longas de glucanas, com diâmetro de até 1,5 nm. A terceira etapa corresponde à organização e a cristalização das cadeias lineares, agregando-se em microfibrilas, de 3-4 nm, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, ficando dispostas em tiras. Como resultado desse processo, há formação de uma estrutura tridimensional e resistente denominada microfibrila de celulose (DONINI et al., 2010; SIEVERS; SWINGS, 2005).

A conversão da glicose transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano ocorre em quatro estágios, sendo catalisados por quatro enzimas: a glicoquinase, responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a fosfoglicomutase, que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato, a UDPG-pirofosforilase (glicose-1-fosfato uridililtransferase), que sintetiza a UDP-glicose, e a celulose sintase, que produz a celulose a partir de UDP-

glicose (DONINI et al., 2010). Resumidamente, a síntese de celulose a partir da glicose pode ser representada conforme mostrado na Figura 4, a seguir.

Figura 4. Esquema da síntese de celulose bacteriana.



Fonte: MAMLOUK; GULLO (2013); HA et al. (2011). Adaptado.

A estrutura cristalina das microfibrilas apresenta duas formas alomórficas de ocorrência natural, que diferem no padrão das ligações de hidrogênio entre as cadeias, sendo elas a celulose I e a celulose II. A celulose I é composta de cadeias paralelas dispostas uniaxialmente através de forças de van der Waals enquanto as cadeias da celulose II são dispostas de forma aleatória. Elas são na maior parte antiparalelas e com grande número de ligações de hidrogênio, o que resulta em uma forma mais estável, porém caracterizada por propriedades mecânicas mais baixas. A celulose I, que é a principal forma encontrada na natureza, pode ocorrer ainda sob

duas formas alomórficas: celulose I α (uma cadeia em uma célula unitária triclínica) e celulose I β (duas cadeias em uma célula unitária monoclínica). As quantidades relativas de celulose I α e I β variam entre amostras de diferentes origens. Enquanto a forma I α é a principal forma encontrada na parede celular de algumas espécies de algas e em celulose bacteriana, a forma I β foi a principal forma encontrada em fibras de algodão e madeira (NISHIYAMA et al., 2003; FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007; HARRIS et al., 2012; GEA et al., 2011). A estrutura microfibrilar da celulose é a responsável pela maioria das suas propriedades, como a alta resistência à tração, alto índice de cristalinidade e maior grau de polimerização (MOHITE; PATIL, 2014).

A síntese de celulose por bactérias pode ocorrer em condições estáticas ou em meio agitado. No entanto, as celulosas obtidas sob estas condições são distintas. Em meio estático, uma película gelatinosa é formada na interface ar-líquido que cresce no sentido descendente. Em meio com agitação, massas irregulares ou esféricas de celulose são formadas e distribuídas no meio. A celulose produzida em meios com agitação exibe um menor grau de polimerização e cristalinidade do que a produzida sob cultivo estático, o que pode ser resultado da tensão de cisalhamento durante a agitação (NEERA; RAMANA; BATRA, 2015; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

1.1.5.6.1. Substratos para bioprodução de celulose por bactérias

Segundo Jozala et al. (2015), os meios de cultura são os principais fatores que determinam os custos do processo para a obtenção de celulose bacteriana. Os meios comuns para a produção, como o Hestrin-Schramm (HS), são limitados para aplicação em grande escala devido ao alto custo (YIM; SONG; KIM, 2016). Assim, vários estudos têm se dedicado a encontrar novas fontes de carbono, de menor custo, a fim de otimizar o bioprocessamento e visando alcançar maiores rendimentos. De acordo com Goelzer et al. (2009), o uso de resíduos agroindustriais é uma interessante alternativa. A Tabela 4, a seguir, apresenta as principais matérias-primas, como cascas de frutas e outros resíduos gerados pela agroindústria, já relatadas para a produção de celulose. Ainda não há relatos do estudo da produção de celulose, utilizando como substrato o melaço de soja, um coproduto gerado pela indústria do processamento da soja, rico em carboidratos e outros nutrientes.

Tabela 4. Matérias-primas utilizadas na produção de celulose bacteriana relatadas na literatura.

Substrato/ Fonte de carbono	Microrganismo	Tempo de fermentação	Condições	Produção de celulose bacteriana	Fonte
Água de coco	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Agitado	17,1 g 200 mL ⁻¹	Almeida et al. (2008)
Bagaço de uva	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	8,0 g L ⁻¹	Vazquez et al. (2013)
Capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>) hidrolisado	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	6,40 g L ⁻¹	Yang et al. (2013b)
Casca de abacaxi	<i>K. hansenii</i>	7 dias	Estático	12,5 g 100 mL ⁻¹	Kumbhar et al. (2015)
Casca de arroz hidrolisada	<i>K. xylinus</i>	10 dias	Estático Agitado	2,42 g L ⁻¹ 1,57 g L ⁻¹	Goelzer et al. (2009)
Casca de café cereja	<i>K. hansenii</i>	14 dias	Estático	5,60 g L ⁻¹	Rani; Appaiah (2013)
Casca de melancia	<i>K. hansenii</i>	7 dias	Estático	10 g 100 mL ⁻¹	Kumbhar et al. (2015)
Casca de uva	<i>G. sacchari</i>	4 dias	Estático	0,63 g L ⁻¹	Carreira et al. (2011)
Casca e bagaço de frutas cítricas hidrolisados	<i>K. xylinus</i>	8 dias	Estático	5,7 g L ⁻¹	Fan et al. (2016)
Chá verde	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Estático	0,20 g L ⁻¹	Nguyen et al. (2008)
Chá preto	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Estático	0,14 g L ⁻¹	Nguyen et al. (2008)
Espiga de milho hidrolisada	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	4,0 g L ⁻¹	Huang et al. (2015)
Extrato de lichia	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	2,53 g L ⁻¹	Yang et al. (2016)
Extrato de uva	<i>K. hansenii</i>	14 dias	Estático	7,47 g L ⁻¹	Rani; Udayasankar; Appaiah (2011)
Feijão e alfarroba hidrolisados	<i>K. xylinus</i>	10 dias	Estático	3,27 g L ⁻¹	Bilgi et al. (2016)
Frutas apodrecidas	<i>K. xylinus</i>	4 dias	Estático	60,2 mg mL ⁻¹	Jozala et al. (2015)

Tabela 4. Matérias-primas utilizadas na produção de celulose bacteriana relatadas na literatura (Continuação).

Substrato/ Fonte de carbono	Microrganismo	Tempo de fermentação	Condições	Produção de celulose bacteriana	Fonte
Glicerol (remanescente da produção de biodiesel)	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	10,0 g L ⁻¹	Vazquez et al. (2013)
Maple syrup	<i>K. xylinus</i>	21 dias	Agitado	1,51 g L ⁻¹	Zeng et al. (2011b)
Melaço de cana	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Estático	1,64 g L ⁻¹	Çakar et al. (2014)
Melaço de beterraba	<i>K. xylinus</i>	5-7 dias	Estático	1,75 g.250 mL ⁻¹	Keshk et al. (2006)
Palha de trigo hidrolisada	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Estático	12,0 g L ⁻¹	Chen et al. (2013b)
Resíduo de cervejaria hidrolisado	<i>K. hansenii</i>	14 dias	Estático	7,02 g L ⁻¹	Lin et al. (2014)
Resíduo da extração de azeite de oliva hidrolisado	<i>G. sacchari</i>	4 dias	Estático	0,85 g. g L ⁻¹	Gomes et al. (2013)
Resíduo têxtil à base de algodão hidrolisado	<i>K. xylinus</i>	14 dias	Estático	10,8 g L ⁻¹	Hong et al. (2012)
Soro de leite	<i>K. xylinus</i>	4 dias	Estático	5,9 mg mL ⁻¹	Jozala et al. (2015)
Suco da casca de abacaxi	<i>G. swingsii</i> sp.	13 dias	Estático	2,80 g L ⁻¹	Castro et al. (2011)
Suco de laranja	<i>K. xylinus</i>	14 dias	-	5,90 g L ⁻¹	Kurosumi et al. (2009)
Vinhaça (resíduo de destilaria de vinho)	<i>K. xylinus</i>	7 dias	Estático	6,26 g L ⁻¹	Wu; Liu (2013)
Xarope de tâmaras	<i>K. xylinus</i>	8 dias	Estático	5,8 g L ⁻¹	Lotfiman et al. (2016)

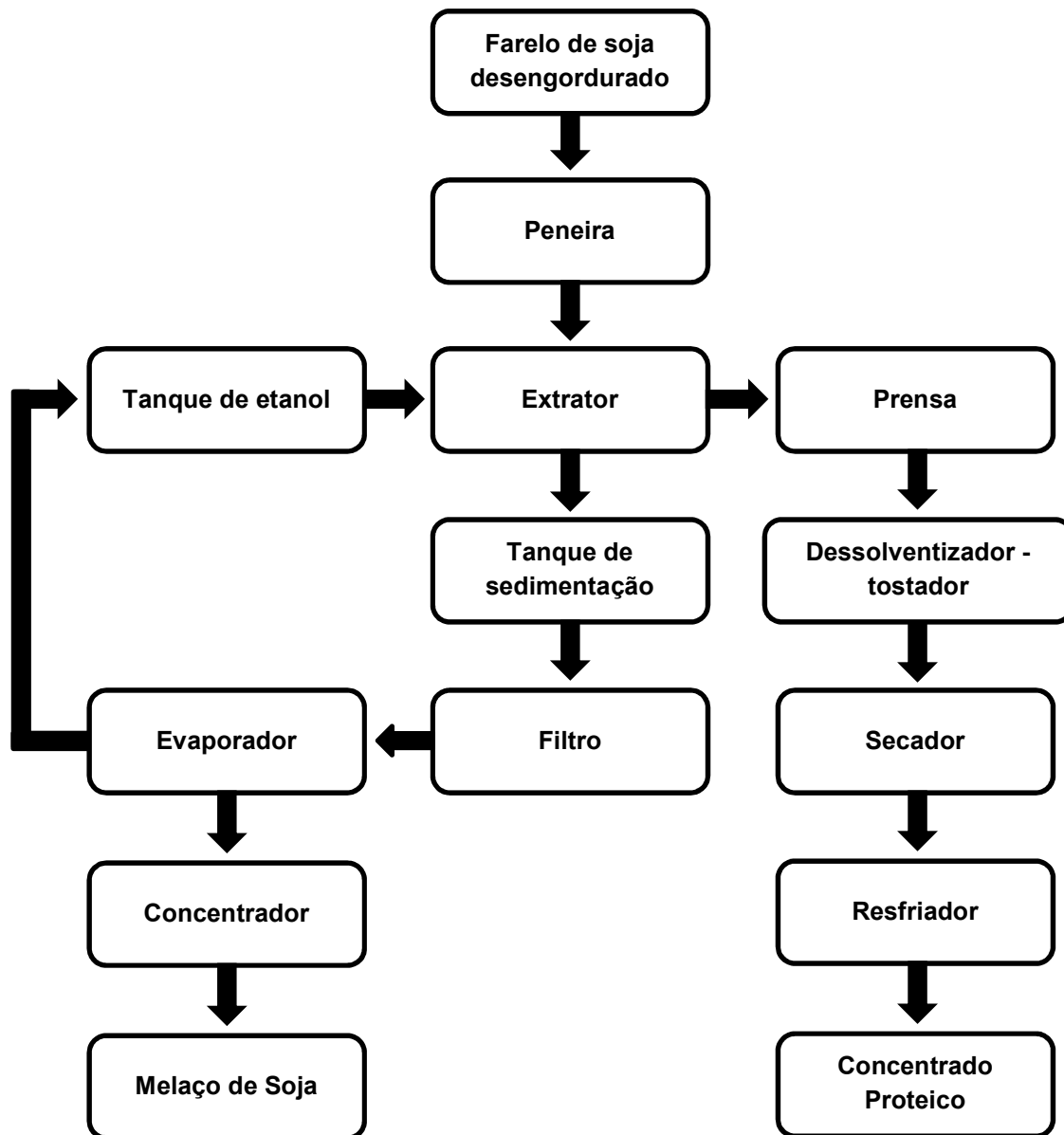
1.1.5.6.1.1. Melaço de Soja

Um dos produtos de soja mais comumente utilizado é o óleo que é obtido por extração a partir dos grãos triturados utilizando um solvente orgânico (geralmente hexano). O farelo proteico residual gerado neste processo pode ser novamente processado originando o concentrado proteico de soja (CPS) e um coproduto denominado melaço de soja. Para a precipitação das proteínas da soja geralmente utiliza-se uma solução extratora de etanol a 70-90%, porém, este processo pode ser também alcançado através da precipitação ácida das proteínas no seu ponto isoelétrico (pH em torno de 4,5) após a solubilização destas em pH alcalino ou ainda por desnaturação das proteínas por calor seguido de extração com água (KACHRIMANIDOU et al., 2015; LONG; GIBBONS, 2013).

Com a crescente demanda por proteínas vegetais de alta qualidade na indústria de alimentação humana e animal, a produção de concentrados proteicos de soja tem aumentado nos últimos anos, gerando anualmente grandes quantidades de melaço de soja (GAO; LI; LIU, 2012). De acordo com Siqueira et al. (2008), partindo-se de um volume inicial de uma tonelada de farelo de soja, podem ser obtidos cerca de 800 kg de concentrado proteico e 200 kg de melaço, conforme o fluxograma de produção apresentado na Figura 5.

O melaço de soja contém tipicamente cerca de 70% de sólidos solúveis, consistindo principalmente de carboidratos (entre 57 a 65% em peso seco) e contendo juntamente quantidades menores de proteínas, lipídeos e minerais. A fração de carboidratos do melaço de soja é composta por mono e dissacarídeos como glicose, frutose e sacarose além de oligossacarídeos, principalmente rafinose e estaquiase. A rafinose é um trissacarídeo composto por frutose e glicose unidas por ligação β -(1 \rightarrow 2), e uma unidade de galactose unida com a glicose através de ligação α -(1 \rightarrow 6). A estaquiase é um tetrassacarídeo que consiste em frutose, glicose e duas moléculas de galactose unidas entre si e com a molécula de glicose através de ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 6) (GULERIA et al., 2008; RAJAN; NAIR, 2010; ZENG et al., 2015). Na Figura 6 é apresentada a estrutura química dos oligossacarídeos que compõem a família da rafinose, onde a sacarose, ligada a uma, duas ou três unidades sequenciais de galactose, por ligação glicosídica do tipo α -(1 \rightarrow 6), forma os oligossacarídeos correspondentes: rafinose, estaquiase e verbascose.

Figura 5. Processo de produção do concentrado proteico e do melação de soja.



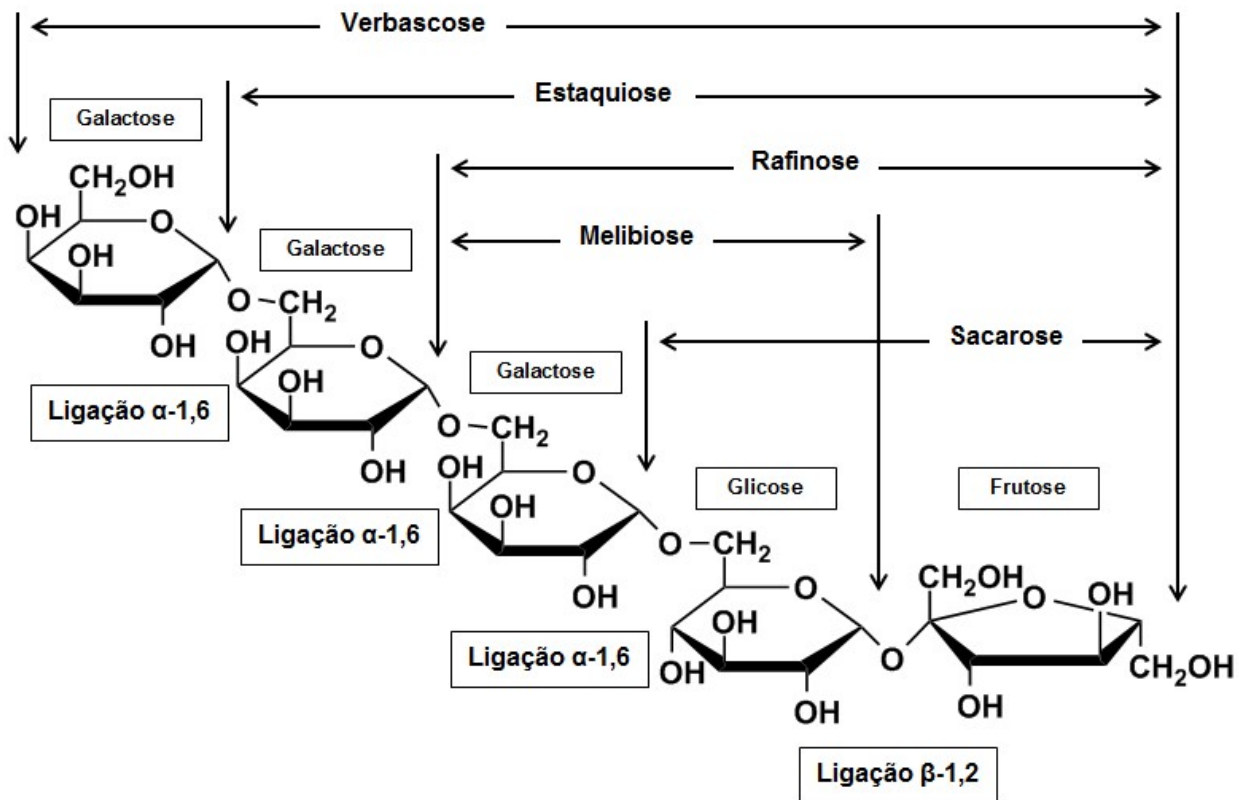
Fonte: Siqueira et al. (2008). Adaptado.

A tabela 5 apresenta a porcentagem em peso seco dos constituintes majoritários e dos carboidratos individuais presentes no melação de soja.

Em função do seu alto teor de açúcares fermentescíveis, além da possibilidade de uso do melação de soja para alimentação animal, este coproduto representa uma matéria-prima potencialmente fermentativa por microrganismos (GAO; LI; LIU, 2012; ROMÃO et al., 2012). Alguns estudos têm relatado o uso do

melaço de soja como um substrato fermentativo, utilizando bactérias e leveduras com a finalidade de obtenção de metabólitos de interesse industrial, como por exemplo, a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* (SIQUEIRA et al., 2008; ROMÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; CALDEIRÃO et al., 2016) e por *Zymomonas mobilis* (LETTI et al., 2012); exopolissacarídeos (EPS) por *Grifola frondosa* (CHIMILOVSKI et al., 2011); proteína microbiana (*Single Cell Protein - SCP*) utilizando *Candida tropicalis* (GAO; LI; LIU, 2012), síntese de solventes combinados (acetona, etanol e butanol) por *Clostridium beijerinckii* BA 101 (QURESHI; LOLAS; BLASCHEK, 2001) e síntese de ácido láctico por *Lactobacillus salivarius* (MONTELONGO; CHASSY; McCORD, 1993).

Figura 6. Estrutura dos oligossacarídeos da soja.



Fonte: Qureshi; Lolas; Blaschek (2001). Adaptado.

Tabela 5. Composição centesimal aproximada do melaço de soja.

Componente	% em peso seco
Carboidratos totais	57 – 65
Glicose	0,2 – 1,3
Frutose	0,1 – 1,6
Galactose	0,25
Sacarose	26 – 32
Rafinose	4 – 10
Estaquiose	19 – 26
Proteínas	5 – 9
Lipídeos	4 – 21
Cinzas	3 – 7
Fibras	6

Fonte: Siqueira et al. (2008); Chajuss (2004).

4. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. M.; WOSIACKI, G.; SANTOS JUNIOR, G.; MADALOZZO, E. S.; ZANLORENZI, M. M. Crescimento do *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) e a produção de celulose bacteriana. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n. 1, p. 95-103, 2008.

ANAV - Associação Nacional das Indústrias de Vinagre. **Indústria investe no vinagre de grife de olho nos gourmets:** Empresários do setor apostam no consumo maior das chamadas linhas especiais. Disponível em: <http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=25>. Acesso em: 05 mar. 2017.

ANDRÉS-BARRAO, C.; FALQUET, L.; CALDERON-COPETE, S. P.; DESCOMBES, P.; PÉREZ, R. O.; BARJA, F. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 10, p. 2670-2671, maio 2011.

ANDRÉS-BARRAO, C.; SAAD, M. M.; CHAPPUIS, M.-L.; BOFFA, M.; PERRET, X.; PÉREZ, R. O.; BARJA, F. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 6, p. 1701-1717, mar. 2012.

ANDRÉS-BARRAO, C.; BENAGLI, C.; CHAPPUIS, M.; PÉREZ, R. O.; TONOLLA, M.; BARJA, F. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 75-81, mar. 2013.

ANDRÉS-BARRAO, C.; SAAD, M. M.; FERRETE, E. C.; BRAVO, D.; CHAPPUIS, M.-L.; PÉREZ, R. O.; JUNIER, P.; PERRET, X.; BARJA, F. Metaproteomics and ultrastructure characterization of *Komagataeibacter* spp. involved in high-acid spirit vinegar production. **Food Microbiology**, v. 55, p. 112-122, maio 2016.

AYED, L.; ABID, S. B.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111-121, jan. 2017.

AYTEKIN, A. Ö.; DEMIRBAĞ, D. D.; BAYRAKDAR, T. The statistical optimization of bacterial cellulose production via semi-continuous operation mode. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, p. 243-250, maio 2016.

BAENA-RUANO, S.; JIMÉNEZ-OT, C.; SANTOS-DUEÑAS, I. M.; CANTERO-MORENO, D.; BARJA, F.; GARCÍA-GARCÍA, I. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1160-1164, maio 2006.

BAENA-RUANO, S.; JIMÉNEZ-OT, C.; SANTOS-DUEÑAS, I. M.; JIMÉNEZ-HORNERO, J. E.; BONILLA-VENCESLADA, J. L.; ÁLVAREZ-CÁLIZ, C.; GARCÍA-GARCÍA, I. Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 908-912, jul. 2010.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60-70, jun. 2008.

BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S.; CAVICCHIOLI, M.; AMARAL, T. S.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; SANTOS, D. M.; PETERSEN, A. L. O. A.; CELES, F.; BORGES, V. M.; OLIVEIRA, C. I.; OLIVEIRA, P. F.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41-51, set. 2015.

BI, J.-C.; LIU, S.-X.; LI, C.-F.; LI, J.; LIU, L.-X.; DENG, J.; YANG, Y.-C. Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1305-1311, nov. 2014.

BILGI, E.; BAYIR, E.; SENDEMIR-URKMEZ, A.; E HAMES, E. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 2-10, set. 2016.

BRASIL. MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6, de 03 de abril de 2012. Estabelece os padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 abr. 2012. Seção 1.

BUDAK, N. H.; AYKIN, E.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Functional properties of vinegar. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. 757-764, maio 2014.

BUNICK, C. G.; LOTT, J. P.; WARREN, C. B.; GALAN, A.; BOLOGNIA, J.; KING, B. A. Chemical burn from topical apple cider vinegar. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 4, p.143-144, out. 2012.

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**, p. 172-180, v. 213, ago. 2016.

ÇAKAR, F.; ÖZER, I.; AYTEKIN, A. Ö.; ŞAHİN, F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 7-13, jun. 2014.

CALDEIRÃO, L.; TANAKA, C.; IDA, E.; SPINOSA, W. Modeling and kinetic study of bio-ethanol production from soy protein concentrate by-product. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, Campinas, abr./jun. 2016.

CAÑETE-RODRÍGUEZ, A. M.; SANTOS-DUEÑAS, I. M.; JIMÉNEZ-HORNERO, J. E.; EHRENREICH, A.; LIEBL, W.; GARCÍA-GARCÍA, I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications – An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1891-1903, dez. 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 from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, ago. 2011.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96-102, fev. 2011.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; ÁLVAREZ, C.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; ROJAS, O. J.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1033-1037, ago. 2012.

CHAJUSS, D. Soy Molasses: Processing and Utilization as a Functional Food. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004.

CHEN, Q.; LIU, A.; ZHAO, J.; OUYANG, Q.; SUN, Z.; HUANG, L. Monitoring vinegar acetic fermentation using a colorimetric sensor array. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 183, p. 608-616, jul. 2013a.

CHEN, L.; HONG, F.; YANG, X.-X.; HAN, S.-F. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464-468, maio 2013b.

CHEN, Y.; BAI, Y.; LI, D.; WANG, C.; XU, N.; WU, S.; HE, S.; HU, Y. Correlation between ethanol resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 6, p. 837-847, jun. 2016.

CHIMILOVSKI, J. S.; HABU, S.; TEIXEIRA, R. F. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NOSEDA, M. D.; MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Antitumour activity of *Grifola frondosa* exopolysaccharides produced by submerged fermentation using sugar cane and soy molasses as carbon sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 359-363, jul./set. 2011.

CIRIGLIANO, M. C. A Selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 1038-1039, maio 1982.

CLEENWERCK, I.; CAMU, N.; ENGELBEEN, K.; DE WINTER, T.; VANDEMEULEBROECKE, K.; DE VOS, P.; DE VUYST, L. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1647-1652, jul. 2007.

CLEENWERCK, I.; DE WACHTER, M.; GONZÁLEZ, A.; DE VUYST, L.; DE VOS, P. Differentiation of species of the Family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1771-1786, jul. 2009.

DAYAL, M. S.; GOSWAMI, N.; SAHAI, A.; JAIN, V.; MATHUR, G.; MATHUR, A. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 12-16, abr. 2013.

DEPPENMEIER, U.; HOFFMEISTER, M.; PRUST, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 233-242, nov. 2002.

DE VERO, L.; GIUDICI, P. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 96-101, jun. 2008.

DONINI, I. A. N.; DE SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossintese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

- DU, X.-J; JIA, S.-R; YANG, Y.; WANG, S. Genome sequence of *Gluconacetobacter* sp. strain SXCC-1, isolated from Chinese vinegar fermentation starter. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3395-3396, jul. 2011.
- ENTANI, E.; OHMORI, S.; MASAI, H.; SUSUKI, K-I. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. **Journal General Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 475-490, 1985.
- FAN, X.; GAO, Y.; HE, W.; HU, H.; TIAN, M.; WANG, K.; PAN, S. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p.1068-1072, out. 2016.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; TORRES, C.; SANZ, S.; RUIZ-LARREA, F. Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 973-978, dez. 2010a.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; TORRES, C.; SANZ, S.; RUIZ-LARREA, F. Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 5, p. 813-819, set. 2010b.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, jan./mar. 2007.
- FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Informativo DEAGRO: Safra Mundial de Soja 2016/17 - 12º Levantamento do USDA**, São Paulo: Departamento do Agronegócio - DEAGRO/FIESP, abr. 2017. Disponível em: < http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/boletim_soja_abril2017/>. Acesso em: 23 maio. 2017.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; O'SHEA, M. G.; LEONARD, G. J.; SLY, L. I. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. **Microbial Ecology**, v. 50, n. 1, p. 128-139, jul. 2005.
- FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures**. 2nd. ed. New York: Springer, 2007.
- GAO, Y.; LI, D.; LIU, Y. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1165-1172, set. 2012.
- GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105-9110, out. 2011.
- GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 9, p. 2749-2766, set. 2012.

GOELZER, F. D. E.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; VITORINO, J. C.; SIERAKOWSKI, M.-R.; TISCHER, C.A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 546-551, mar. 2009.

GOMES, F. P.; SILVA, N. H. C. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; DUARTE, M. F.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; FREIRE, C. S. R. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205-211, ago. 2013.

GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 123-128, jan. 2006.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 547-557, abr. 2012.

GULERIA, S.; SHARMA, S.; GILL, B. S.; MUNSHI, S. K. Distribution and biochemical composition of large and small seeds of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 2, p. 269-272, jan. 2008.

GULLO, M.; CAGGIA, C.; DE VERO, L.; GIUDICI, P. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 209-212, fev. 2006.

GULLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 46-53, jun. 2008.

GULLO, M.; VERZELLONI, E.; CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1571-1579, out. 2014.

HA, J. H.; SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Bacterial cellulose production from a single sugar α -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1717-1723, set. 2011.

HARRIS, D. M.; CORBIN, K.; WANG, T.; GUTIERREZ, R.; BERTOLO, A. L.; PETTI, C.; SMILGIES, D. M.; ESTEVEZ, J. M.; BONETTA, D.; URBANOWICZ, B. R.; EHRHARDT, D. W.; SOMERVILLE, C. R.; ROSE, J. K. C.; HONG, M.; DEBOLT, S. Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1^{A903V} and CESA3^{T942I} of cellulose synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4098-4103, mar. 2012.

HATTORI, H.; YAKUSHI, T.; MATSUTANI, M.; MOONMANGMEE, D.; TOYAMA, H.; ADACHI, O.; MATSUSHITA, K. High-temperature sorbose fermentation with thermotolerant *Gluconobacter frateurii* CHM43 and its mutant strain adapted to higher temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 6, p. 1531-1540, set. 2012.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemistry Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-342, out. 1954.

HONG, F.; GUO, X.; ZHANG, S.; HAN, S.-F.; YANG, G.; JÖNSSON, L. J. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 503-508, jan. 2012.

HUANG, C.; YANG, X.-Y.; XIONG, L.; GUO, H.-J.; LUO, J.; WANG, B.; ZHANG, H.-R.; LIN, X.-Q.; CHEN, X.-D. Utilization of corncob acid hydrolysate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1678-1688, fev. 2015.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, jul. 2014.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA JÚNIOR, A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181-1190, fev. 2015.

KACHRIMANIDOU, V.; KOPSAHELIS, N.; ALEXANDRI, M.; STRATI, A.; GARDELI, C.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; KOOKOS, I. K.; KOUTINAS, A. A. Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidants, protein isolate and poly(3-hydroxybutyrate). **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 106-113, set. 2015.

KESHK, S. M. A. S.; RAZEK, T. M. A.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 17, p. 1519-1523, set. 2006.

KOMAGATA, K.; IINO, T.; YAMADA, Y. The Family Acetobacteraceae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria**. Springer, 2014.

KOSE, R.; SUNAGAWA, N.; YOSHIDA, M.; TAJIMA, K. One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using *Gluconacetobacter intermedius* NEDO-01. **Cellulose**, v. 20, n. 6, p. 2971-2979, dez. 2013.

KUMBHAR, J. V.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6677-6691, ago. 2015.

KUO, C.-H.; CHEN, J.-H.; LIOU, B.-K.; LEE, C.-K. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 98-103, fev. 2016.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333-335, mar. 2009.

LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p. 80-86, set. 2012.

LI, Y.; TIAN, C.; TIAN, H.; ZHANG, J.; HE, X.; PING, W.; LEI, H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1479-1487, dez. 2012.

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; LI, R.; LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113-119, jan. 2014.

LIN, D.; LI, R.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; LI, Z. Physical properties of bacterial cellulose aqueous suspensions treated by high pressure homogenizer. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 435-442, fev. 2015.

LIN, S.-P.; HUANG, Y.-H.; HSU, K.-D.; LAI, Y.-J.; CHEN, Y.-K.; CHENG, K.-C. Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 827-833, out. 2016.

LONG, C. C.; GIBBONS, W. R. Conversion of soy molasses, soy solubles, and dried soybean carbohydrates into ethanol. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 6, n. 1, p. 62-68, mar. 2013.

LOTFIMAN, S.; BIAK, D. R. A.; TI, T. B.; KAMARUDIN, S.; NIKBIN, S. Influence of date syrup as a carbon source on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 0416. **Advances in Polymer Technology**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2016.

DOI: 10.1002/adv.21759. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adv.21759/abstract>>.

Acesso em: 26 jan. 2017.

MAMLOUK, D.; GULLO, M. Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 377-384, out./dez. 2013.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43-51, abr. 2008.

MARQUES, F. P. P.; SPINOSA, W.; FERNANDES, K. F.; CASTRO, C. F. S.; CALIARI, M. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 119-126, maio 2010.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, abr. 2014.

MARTINS, C. F. G. **Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do ácido acético isoladas de alimentos**. 2012. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 2012.

MAS, A.; TORIJA, M. J.; GARCÍA-PARRILA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. **The Scientific World Journal**, v. 2014, jan. 2014.

MATTHEWS, J. F.; BERGENSTRÄHLE, M.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; CROWLEY, M. F. High-temperature behavior of cellulose I. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 10, p 2155-2166, fev. 2011.

MAUGERI FILHO, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentivos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. p. 125-149.

MESA, M. M.; MACÍAS, M.; CANTERO, D.; BARJA, F. Use of the Direct Epifluorescent Filter Technique for the Enumeration of Viable and Total Acetic Acid Bacteria from Vinegar Fermentation. **Journal of Fluorescence**, v. 13, n. 3, p. 261-265, maio 2003.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518-523, mar. 2015.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 132-141, jun. 2014.

MONTELONGO, J.-L.; CHASSY, B. M.; McCORD, J. D. *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 863-866, jul. 1993.

MOUNIR, M.; SHAFIEI, R.; ZARMEHRKHORSHID, R.; HAMOUDA, A.; ALAOUI, M. I.; THONART, P. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 166-171, fev. 2016.

MUYNCK, C.; PEREIRA, C. S. S.; NAESSENS, M.; PARMENTIER, S.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. The Genus *Gluconobacter* Oxydans: Comprehensive Overview of Biochemistry and Biotechnological Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 3, 2007.

NAKANO, S.; FUKAYA, M. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 54-59, jun. 2008.

NEERA; RAMANA, K. V.; BATRA, H. V. Occurrence of cellulose-producing *Gluconacetobacter* spp. in fruit samples and Kombucha tea, and production of the biopolymer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 4, p. 1162-1173, jun. 2015.

NGUYEN, V. T.; FLANAGAN, B.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Current Microbiology**, v. 57, p. 449-453, nov. 2008.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, dez. 2015.

NISHIYAMA, Y.; SUGIYAMA, J.; CHANZY, H.; LANGAN, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14300-14306, 2003.

OHMORI, S.; MASAI, H.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2901-2906, 1980.

OLIVEIRA, A. L. D.; SANTOS JUNIOR, V.; LIOTTI, R. G.; ZILIOLO, E.; SPINOSA, W. A.; RIBEIRO-PAES, J. T. Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 106-112, jan./mar. 2010.

PARK, J. K.; JUNG, J. Y.; PARK, Y. H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 24, p. 2055-2059, dez. 2003.

QURESHI, N.; LOLAS, A.; BLASCHEK, H. P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 290-295, maio 2001.

RAJAN, A.; NAIR, G. R. Production of soya milk containing low flatulence-causing oligosaccharides in a packed bed reactor using immobilised α -galactosidase. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 2023-2031, out. 2010.

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

RANI, M. U.; UDAYASANKAR, K.; APPAIAH, K. A. A. Properties of bacterial cellulose produced in grape medium by native Isolate *Gluconacetobacter* Sp. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 5, p. 2835-2841, jun. 2011.

RANI, M. U.; APPAIAH, K. A. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 755-762, jul./ago. 2013.

RASPOR, P.; GORANOVIČ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101-124, 2008.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 4, p. 2310-2316, mar. 2012.

RUIZ, A.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1981-1987, nov. 2000.

SAINZ, F.; NAVARRO, D.; MATEO, E.; TORIJA, M. J.; MAS, A. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 40-47, abr. 2016.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; QUINTANA, E.; IBARRA, D.; GOMEZ, N.; LADERO, M.; EUGENIO, M. E.; VILLAR, J. C. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 173-181, fev. 2015.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, p. 123-129, 1954.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 647-656, maio 2011.

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187-1191, ago. 2011.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539-545, mar. 2014.

SIEVERS, M.; SCHLEGEL, H.-G.; CABALLERO-MELLADO, J.; DÖBEREINER, J.; LUDWIG, W. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 505-508, dez. 1998.

SIEVERS, M.; SWINGS, J. Family II. Acetobacteraceae. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. 2nd. ed. New York: Springer, 2005. v. 2.

SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO, E. J. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 61-68, dez. 2012.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J.-L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, nov. 2008.

SOKOLLEK, S. J.; HAMMES, W. P. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 481-491, ago. 1997.

SONG, N.-E.; CHOB, S.-H.; BAIK, S.-H. Microbial community, and biochemical and physiological properties of Korean traditional black raspberry (*Robus coreanus* Miquel) vinegar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 11, p. 3723-3730, ago. 2016.

SPINOSA, W. A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. 1996. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1996.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. 2002. 244 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

SPINOSA, W. A.; SANTOS JÚNIOR, V.; GALVAN, D.; FIORIO, J. L.; GOMEZ, R. J. H. C. Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 1, p. 196-201, jan./mar. 2015.

STASIAK, L.; BŁAŻEJAK, S. Acetic acid bacteria – Perspectives of application in biotechnology – A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 59, n. 1, p. 17-23, 2009.

TANG, W.; JIA, S.; JIA, Y.; YANG, H. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 125-131, jan. 2010.

TEUBER, M.; SIEVERS, M.; ANDRESEN, A. Characterization of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 4, p. 265-268, abr. 1987.

TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 257-265, abr. 2010.

TRČEK, J.; BARJA, F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 137-144, mar. 2015.

TRČEK, J.; MAHNIČ, A.; RUPNIK, M. Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 57-62, abr. 2016.

TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1417-1420, ago. 2011.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596-603, abr. 2012.

UL-ISLAM, M.; HA, J. H.; KHAN, T.; PARK, J. K. Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 360-366, jan. 2013.

UYSAL, R. S.; SOYKUT, E. A.; BOYACI, I. H.; TOPCU, A. Monitoring multiple components in vinegar fermentation using Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4333-4343, dez. 2013.

VALERA, M. J.; TORIJA, M. J.; MAS, A.; MATEO, E. Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. **Food Microbiology**, v. 46, p. 452-462, abr. 2015.

VANIN, A. M.; SALVADOR, M.; RICALDE, S. R.; SIVIERO, J. Atividade antioxidante e perfil fenólico de diferentes tipos de vinagres comercializados na região sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2012.

VAZQUEZ, A.; FORESTI, M. L.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545-554, jun. 2013.

VEGAS, C.; MATEO, E.; GONZÁLEZ, A.; JARA, C.; GUILLAMÓN, J. M.; POBLET, M.; TORIJA, M. J.; MAS, A. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 130-136, mar. 2010.

WANG, B.; SHAO, Y.; CHEN, F. Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 255-263, fev. 2015.

WU, J.-J.; GULLO, M.; CHEN, F.-S.; GIUDICI, P. Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. **Current Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 280-286, abr. 2010.

WU, J. J.; MA, Y. K.; ZHANG, F. F.; CHEN, F. S. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 289-297, maio 2012.

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.

XAVIER, D.; IVANOV, R. C.; CUNHA, M. A. A.; PEREIRA, E. A. Produção e caracterização de vinagre de *Fisalis*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v.2, n.1, p.27-32, jan./jun., 2011.

YAKUSHI, T.; MATSUSHITA, K. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1257-1265, maio 2010.

YAMANAKA, S.; WATANABE, K.; KITAMURA, N.; IGUCHI, M.; MITSUHASHI, S.; NISHI, Y.; URYU, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **Journal of Materials Science**, v. 24, n. 9, p. 3141-3145, Set. 1989.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 15-24, jun. 2008.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; NAKAGAWA, Y. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -*Proteobacteria*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 849-859, jun. 2012.

YANG, X.-Y.; HUANG, C.; GUO, H.-J.; XIONG, L.; LI, Y.-Y.; ZHANG, H.-R.; CHEN, X.-D. Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 995-1002, out. 2013a.

YANG, Y.; JIA, J.; XING, J.; CHEN, J.; LU, S. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* Cls26. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2012-2017, fev. 2013b.

YANG, X.-Y.; HUANG, C.; GUO, H.-J.; XIONG, L.; LUO, J.; WANG, B.; LIN, X.-Q.; CHEN, X.-F.; CHEN, X.-D. Bacterial cellulose production from the litchi extract by *Gluconacetobacter xylinus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 39-43, 2016.

YETIMAN, A. E.; KESMEN, Z. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 9-16, jul. 2015.

YIM, S. M.; SONG, J. E.; KIM, H. R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. **Process Biochemistry**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.001>.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316302446>>.

Acesso em: 20 abr. 2017.

ZANCANARO JUNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4. p. 183-223.

ZENG, X.; LIU, J.; CHEN, J.; WANG, Q.; LI, Z.; WANG, H. Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1993-1999, dez. 2011a.

ZENG, X.; SMALL, D. P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 506-513, jun. 2011b.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455-4469, dez. 2014.

ZENG, A.; CHEN, P.; ZHANG, B.; ORAZALY, M.; FLOREZ-PALACIOS, L.; BRYE, K. R. Identification and confirmation of quantitative trait loci for stachyose content in soybean seed. **Plant Breeding**, v. 134, n. 2, p. 178-185, abr. 2015.

ZHOU, L. L.; SUN, D. P.; HU, L. Y.; LI, Y. W.; YANG, J. Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, p. 483-483, jul. 2007.

CAPÍTULO 2:

BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO: ISOLAMENTO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SÍNTESE DE CELULOSE BACTERIANA E ÁCIDO ACÉTICO, A PARTIR DE MELAÇO DE SOJA

RESUMO

As bactérias do ácido acético pertencem a um grupo de microrganismos com importante aplicação industrial na produção de vinagres. Além do ácido acético, algumas linhagens são capazes de sintetizar celulose, um biopolímero reconhecido por suas propriedades e aplicação industrial. Neste trabalho objetivou-se isolar linhagens de bactérias do ácido acético a partir de uma indústria de vinagres a fim de estudar o seu potencial uso na produção de celulose bacteriana e ácido acético, utilizando como substrato fermentativo o melaço de soja, coproduto do processamento da soja. O melaço caracterizado apresentou, em média, 70,4 g 100 g⁻¹ de carboidratos, dentre os quais os principais foram sacarose, estaquiase e rafinose, contendo juntamente proteínas, lipídeos e minerais, principalmente potássio. Foram obtidos sete microrganismos isolados a partir de caldos de fermentação de vinagre que foram caracterizados como bactérias do ácido acético após testes bioquímicos. Dentre os microrganismos isolados, cinco produziram celulose no meio Hestrin-Schramm (HS). O meio de cultura a base de melaço de soja mostrou-se adequado para a biossíntese, aumentando a produção de 3,7 g L⁻¹, obtido no meio HS após 14 dias, para 10,0 g L⁻¹, no meio contendo melaço de soja e 2% de etanol. Ao longo da fermentação, obteve-se uma acidez máxima de 1,9 g 100 mL⁻¹ com um rendimento de 92,6%. Frutose, glicose, xilose e sacarose foram os carboidratos consumidos, não sendo observado consumo para os oligossacarídeos rafinose e estaquiase. As membranas de celulose produzidas no meio à base de melaço de soja mostraram-se similares às obtidas no meio HS, de referência, em relação à estrutura química, cristalinidade e degradação térmica. A capacidade de retenção de água e taxas de reidratação e produção diferiram estatisticamente, demonstrando que as variáveis microrganismos e/ou substratos utilizados podem interferir no bioprocessamento e nas propriedades das membranas.

Palavras-chave: Isolamento. Microrganismos. Fermentação. Coproduto. Celulose.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do ácido acético (BAA) são microrganismos estritamente aeróbios, Gram-negativos ou Gram-variável, catalase positivos e em forma de bastonetes, ocorrendo de forma única, em pares ou em cadeias. São utilizadas há séculos na produção de vinagre por sua capacidade em oxidar o etanol a ácido acético. São descritos atualmente diversos gêneros e espécies destes microrganismos sendo que os gêneros *Acetobacter*, *Komagataeibacter* (anteriormente *Gluconacetobacter*) e *Gluconobacter* são os principais gêneros associados à produção de vinagre (ANDRÉS-BARRAO et al., 2012; TORIJA et al., 2010).

Outro metabólito de interesse industrial, produzido por estas bactérias, principalmente por espécies do gênero *Komagataeibacter*, como a *K. xylinus*, é a celulose bacteriana, um polímero de dimensões nanométricas, que possui propriedades superiores à celulose vegetal, tais como maior grau de pureza, cristalinidade e polimerização, melhor capacidade de absorção e retenção de água, maior resistência à tração, maior elasticidade e excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (KUO et al., 2016; LIN et al., 2016). Devido às propriedades incomuns da celulose bacteriana, não encontradas na celulose vegetal, pesquisas têm buscado encontrar meios de cultura alternativos à produção microbiológica de celulose, que possam substituir os meios tradicionais, no intuito de reduzir os custos de produção. Cita-se como exemplo o uso de cascas e bagaço de frutas (FAN et al., 2016; KUMBHAR et al., 2015; VAZQUEZ et al., 2013), melão de cana-de-açúcar (ÇAKAR et al., 2014), palha de trigo (CHEN et al., 2013) soro de leite (JOZALA et al., 2015) e outros resíduos agroindustriais (GOMES et al., 2013; HONG et al., 2012; LIN et al. 2014).

O melão de soja é um coproduto industrial gerado durante o processamento da soja, especificamente após a extração do óleo e da produção do concentrado proteico de soja (CPS). Ele é obtido por concentração dos açúcares, utilizando uma solução extratora de etanol e contém cerca de 70% de sólidos solúveis, consistindo principalmente de carboidratos. Além dos carboidratos, o melão contém ainda quantidades significativas de proteínas, lipídeos, fibras e minerais, sendo, atualmente, utilizado principalmente para alimentação animal (LONG; GIBBONS, 2013; GAO; LI; LIU, 2012).

O melaço de soja representa uma matéria-prima residual, com potencial fermentativo por bactérias e leveduras. Considerando que, industrialmente, os processos fermentativos têm como principais objetivos o baixo custo de produção, matérias-primas facilmente disponíveis e a seleção de microrganismos com alto rendimento, o estudo da produtividade de bactérias do ácido acético na fermentação do melaço de soja, para produção conjunta de celulose e ácido acético, pode significar uma possibilidade de uso para este coproduto.

Baseado nisto, este trabalho objetivou isolar e selecionar linhagens de bactérias do ácido acético, a fim de avaliar o potencial de síntese de celulose bacteriana e ácido acético, utilizando como substrato o melaço de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Matéria-Prima

Esta pesquisa utilizou como matéria-prima para a produção conjunta de ácido acético e celulose bacteriana, o melaço de soja, coproduto do processamento da soja, fornecido pela indústria produtora Selecta[®] (Araguari – MG), na forma concentrada (65–70 °Brix).

2.1.2. Microrganismos

As bactérias utilizadas foram isoladas a partir de caldos de fermentação de vinagres de frutas e cereais, obtidos junto à indústria “Tecnologia em Saúde Indústria de Alimentos”, localizada na cidade de Assis - SP.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização da matéria-prima

O melaço de soja foi caracterizado em relação aos teores de umidade por secagem em estufa a 105 °C, cinzas por incineração em mufla a 550 °C e proteínas

pelo método de Kjeldahl, conforme as respectivas metodologias da AOAC (2012). O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Bligh-Dyer (1959).

Os carboidratos presentes no melaço de soja foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo a líquido (Shimadzu, Quioto, Japão) acoplado com sistema de detecção por índice de refração RID-10A e gerenciado pelo software LC Solutions (Shimadzu, Quioto, Japão). As amostras adequadamente diluídas e centrifugadas (Hitachi, Tóquio, Japão) a 50000 rpm por 15 minutos foram passadas em cartucho Sep-Pak C18 (Waters, Milford, EUA) pré-condicionado com metanol e água, e em filtro com membrana Durapore® de fluoreto de polivinilideno (PVDF), de 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade (Millipore Millex - GV, Irlanda), antes de serem levadas ao sistema cromatográfico para análise. A eluição foi realizada em coluna analítica Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm, 9,0 µm, Bio-Rad, EUA) contendo resina de troca iônica na forma Pb^{+2} , mantida a temperatura constante de 85 °C. A eluição ocorreu em sistema isocrático utilizando água ultrapura Milli-Q (Merck Millipore, EUA) como fase móvel, conforme descrito por Pauli et al. (2011) e Siqueira et al. (2008), a uma vazão de 1,0 mL/min. A quantificação foi realizada com as curvas de calibração dos padrões Sigma (Sigma-Aldrich, EUA) de glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose, estaquiase e xilose de concentrações conhecidas.

A determinação dos elementos magnésio (Mg), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), boro (B), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn) e molibdênio (Mo) foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Varian 820-MS). O plasma foi gerado a partir de argônio, com vazão principal de 17 L min⁻¹ e do nebulizador de 0,21 L min⁻¹, potência de radiofrequência (RF) de 1400W, utilizando os isótopos mais abundantes de cada elemento. Para o elemento cálcio (Ca), foi utilizada a espectrometria de absorção atômica (Varian AA-140), equipado com lâmpada de deutério para correções de fundo e uma lâmpada monoelementar de Ca, cujo comprimento de onda selecionado foi de 422 nm, operando a 4 mA. A taxa de fluxo foi de 3,50 e 1,50 L min⁻¹ para ar e acetileno, respectivamente. Potássio (K) foi determinado em fotômetro de chama (Micronal B462), e o fósforo (P), em espectrofotômetro visível (Micronal AJX-1600), através do método de formação do complexo de molibidênio e fósforo em comprimento de onda de 660 nm. Antes de serem submetidas às análises, as amostras foram incineradas em mufla a 550 °C e as cinzas digeridas em ácido nítrico concentrado.

A concentração de fibras foi estimada por diferença.

2.2.2. Isolamento dos microrganismos

Os meios de cultura utilizados para cultivo e recuperação dos microrganismos foram: MYP (25 g L⁻¹ de manitol, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g L⁻¹ de peptona), AE (5 g L⁻¹ de glicose, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g L⁻¹ de peptona, 20 mL L⁻¹ de etanol absoluto e 10 mL L⁻¹ de ácido acético glacial), RAE (40 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de peptona, 3,38 g L⁻¹ de Na₂HPO₄·2H₂O, 1,5 g L⁻¹ de ácido cítrico, 20 mL L⁻¹ de etanol absoluto e 10 mL L⁻¹ de ácido acético glacial) e HS (20 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de peptona, 2,7 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 1,15 g L⁻¹ de ácido cítrico). Alíquotas dos fermentadores foram transferidas para frascos contendo os meios descritos acima e incubados a 30±0,5 °C e 120 rpm de agitação. Após turvação do meio, 0,1 mL foi transferido para placas de Petri contendo ágar MYP. A técnica de preparo do meio sólido foi a da dupla camada, proposta por Entani et al. (1985), com adição de uma camada inferior com 0,5% em ágar e uma sobrecamada contendo 1,0% de ágar. O isolamento dos microrganismos foi realizado por esgotamento em ágar, seguido de coloração de Gram, após o crescimento de colônias com características morfológicas semelhantes. Bactérias Gram-negativas e em forma de bastonetes foram selecionadas para continuação dos experimentos.

2.2.3. Caracterização bioquímica dos microrganismos

A partir das linhagens obtidas nas etapas de isolamento e purificação, foram realizados testes de oxidação do etanol e superoxidação do ácido acético, através da inoculação de uma alçada, em placas de Petri contendo meio de Carr (30 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de etanol, 0,022 g L⁻¹ de indicador verde de bromocresol e 10 g L⁻¹ de ágar). Uma mudança de cor do meio de verde para amarelo indica a oxidação do etanol a ácido acético, e o retorno da cor verde do meio após longo período de incubação, indica a oxidação do ácido acético produzido (SPINOSA, 2002). Demais provas bioquímicas para caracterização dos microrganismos isolados foram: oxidação de lactato em ágar DSM (Cirigliano, 1982) (1 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de lactato de cálcio, 2 g L⁻¹ de manitol, 1 g L⁻¹ de sorbitol,

3,3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de proteose peptona, 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,02 g L⁻¹ de MnSO₄, 0,03 g L⁻¹ de indicador púrpura de bromocresol e 10 g L⁻¹ de ágar); produção de catalase, observada pelo borbulhamento após adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% diretamente sobre as colônias crescidas nas placas de Petri contendo ágar MYP; teste de produção de ácido a partir de glicose, observado pelo aparecimento de uma zona clara em torno das colônias crescidas em ágar contendo CaCO₃ (30 g L⁻¹ de extrato de levedura, 100 g L⁻¹ de glicose, 30 g L⁻¹ de carbonato de cálcio, 20 g L⁻¹ de ágar); teste de produção de celulose, a qual foi detectada pela formação de película amarelo creme após incubação em caldo HS em estufa bacteriológica a 30±0,5 °C, em condições estáticas; e teste de produção de indol do triptofano, constatada após adição de 0,1 mL do reativo de Kovacs em tubos contendo 10 g L⁻¹ de triptona, seguido de agitação e leitura dos tubos. Uma coloração vermelha do anel superficial no álcool butílico do reativo indicou resultado positivo e a coloração amarela indicou resultado negativo. Por fim, a produção de dihidroxiacetona foi detectada cobrindo-se as placas inoculadas em meio específico (30 g L⁻¹ de extrato de levedura, 30 mL L⁻¹ de glicerol e 20 g L⁻¹ de ágar) com uma mistura de porções iguais de solução de Fehling A (69,3 g L⁻¹ de sulfato de cobre) e Fehling B (346 g L⁻¹ de tartarato de potássio e sódio e 500 g L⁻¹ de hidróxido de potássio). A formação de um halo de óxido cuproso de cor alaranjada indicou a produção de dihidroxiacetona de glicerol (SPINOSA, 2002).

2.2.4. Preparo do inóculo e produção de celulose e ácido acético

Os microrganismos selecionados como produtores de celulose e ácido foram utilizados para os testes de produção em meio à base de melaço de soja. Uma alçada das colônias a partir das placas contendo os microrganismos foram transferidas para frascos contendo meio líquido HS estéril e cultivados por cerca de 10 dias a 30±0,5 °C, em condições estáticas. Após crescimento, observado pela formação de película na superfície do meio, 10% de inóculo foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 500 mL e 250 mL de capacidade, contendo melaço de soja estéril, diluído a 20 °Brix, e 2% de etanol de soja, esterilizado previamente em filtro de membrana PVDF 0,22 µm, totalizando o volume final de fermentação de 100 mL e 50 mL, respectivamente. Os frascos contendo o meio descrito e o inóculo, em triplicata para cada linhagem utilizada, foram incubados em estufa bacteriológica por

14 dias a $30\pm 0,5$ °C, em condições estáticas. A produção de celulose no meio de referência ocorreu da mesma forma, transferindo-se 10% do inóculo para frascos Erlenmeyers contendo caldo Hestrin–Schramm (1954) estéril, e incubados em estufa bacteriológica durante 14 dias a $30\pm 0,5$ °C, em condições estáticas. As películas de celulose produzidas na superfície de cada meio foram recolhidas e aquecidas numa solução de NaOH 1M à 80 °C por 30 minutos e lavadas em seguida com água destilada até o pH neutro para remoção da solução alcalina (JAHAN et al., 2012). As películas obtidas após o tratamento foram secas em estufa a 105 °C até obtenção de peso constante, para determinação dos respectivos rendimentos.

2.2.5. Caracterização dos produtos da fermentação

2.2.5.1. Produção de ácido

Para o acompanhamento da produção de ácido no melaço de soja fermentado, alíquotas do caldo em fermentação foram removidas diariamente para medição do pH, em potenciômetro digital (pHmetro PG2000, GEHAKA, Brasil) e da acidez expressa em porcentagem de ácido acético, por titulação da amostra com solução padrão de NaOH 0,1 M, contendo indicador fenolftaleína.

2.2.5.2. Consumo de açúcares

O consumo das fontes de carbono foi determinado avaliando-se os açúcares restantes no meio através de um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Quioto, Japão) acoplado com sistema de detecção por índice de refração RID-10A, gerenciado pelo software LC Solutions (Shimadzu, Quioto, Japão). As amostras previamente diluídas e centrifugadas (Hitachi, Tóquio, Japão) a 50000 rpm por 15 minutos foram passadas em cartucho Sep-Pak C18 (Waters, Milford, EUA) pré-condicionado com metanol e água, e em filtro com membrana Durapore® de fluoreto de polivinilideno (PVDF), de 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade (Millipore Millex - GV, Irlanda). A eluição ocorreu em coluna analítica Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm, 9,0 µm, Bio-Rad, EUA), mantida a temperatura constante de 85 °C utilizando água ultrapura Milli-Q (Merck Millipore, EUA) como fase móvel, a uma vazão de 1,0 mL/min (PAULI et al., 2011).

2.2.5.3. Caracterização da celulose bacteriana

2.2.5.3.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um analisador (TGA 50—Shimadzu), em uma atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}). As amostras foram aquecidas de 0 a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A partir das curvas de porcentagem de massa em função da temperatura foram calculados os parâmetros de T_{onset} , $T_{10\%}$ (temperatura em que a amostra perde 10% da sua massa), perda de massa em $600 \text{ }^\circ\text{C}$ e resíduo a $550 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.5.3.2. Difração de raios-X (DRX)

Os espectros de difração de raios X (XRD) das membranas de celulose bacteriana foram obtidos utilizando um difratômetro Panalytical X'Pert PRO MPD (Holanda), utilizando radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV e 30 mA. Todos os ensaios foram realizados com rampa a $1^\circ / \text{min}$, analisando a faixa de 5° – 40° (2θ). O grau de cristalinidade foi determinado para a celulose I como descrito por Segal et al. (1959).

2.2.5.3.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras foram caracterizadas por Espectroscopia de infravermelho usando um FT-IR Bommen MB-100, no modo de transmissão, ao longo do intervalo 4000 – 400 cm^{-1} sob uma atmosfera de N_2 . As membranas submetidas à análise foram secas anteriormente em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Os espectros foram obtidos com uma resolução de 1 cm^{-1} e um total de 8 varrimentos por amostra.

2.2.5.3.4. Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água das membranas foi determinada conforme método descrito por Lin et al. (2014), no qual as amostras úmidas foram retiradas do recipiente de armazenamento e pesadas logo após serem rapidamente agitadas

(PCB_{úmida}). Em seguida, as amostras foram secas, a 60 °C, durante 24 horas, até a remoção completa da água e pesadas novamente (PCB_{seca}). A CRA foi obtida através da fórmula:

$$\text{Capacidade de retenção de água} = \frac{\text{PCB}_{\text{úmida}} - \text{PCB}_{\text{seca}}}{\text{PCB}_{\text{seca}}}$$

2.2.5.3.5. Taxa de reidratação (TR)

As membranas submetidas à secagem no procedimento anterior foram pesadas e imersas em água destilada até não haver mais aumento do peso das amostras reidratadas (PCB_{reidratada}). A TR representa o grau em que a água removida foi restituída, sendo calculada conforme Huang et al. (2010):

$$\text{Taxa de reidratação (\%)} = \frac{\text{PCB}_{\text{reidratada}} - \text{PCB}_{\text{seca}}}{\text{PCB}_{\text{úmida}} - \text{PCB}_{\text{seca}}} \times 100$$

2.2.6. Parâmetros de Rendimento e Produtividade

2.2.6.1. Cálculo de rendimento em ácido acético

O rendimento em ácido acético foi calculado em função do álcool inicial e da acidez produzida, conforme descrito por Spinosa (1996):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{AA} \times 0,77 \times 100}{\text{Et}}$$

Sendo que:

0,77 é o rendimento estequiométrico na conversão de etanol em ácido acético (1 mol de etanol (46 g) : 1 mol de ácido acético (60 g));

Et é a concentração de etanol inicial (g 100 mL⁻¹);

AA é a concentração de ácido acético produzida (g 100 mL⁻¹).

2.2.6.2. Rendimento e produtividade da celulose bacteriana

Os parâmetros de produtividade, rendimento sobre os açúcares consumidos e taxa de conversão de substrato, foram calculados, respectivamente, como segue (CARREIRA et al., 2011):

$$\text{Produtividade (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{m_{CB}}{V \times t}$$

$$\text{Rendimento sobre os açúcares consumidos (\%)} = \frac{m_{CB} / V}{S_i - S_f} \times 100$$

$$\text{Taxa de conversão de substrato (\%)} = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$$

Onde S_i é a concentração inicial de substrato (g L^{-1}), S_f é a concentração residual de substrato (g L^{-1}), m_{CB} é a quantidade de celulose produzida (g), V é o volume da fermentação (L) e t é o tempo de fermentação (h).

2.2.7. Análise Estatística

Os resultados de rendimento máximo de celulose bacteriana, CRA e TR das amostras produzidas foram comparados estatisticamente entre as bactérias isoladas e entre os substratos utilizados nas fermentações, por meio de análise de variância (ANOVA). Para isso, realizou-se o teste de Tukey, em nível de 5% de significância, utilizando o software estatístico R[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização físico-química do melão de soja

A Tabela 1, a seguir, apresenta os resultados da composição físico-química do melão de soja, expressos em base seca. Os carboidratos são os componentes principais do melão de soja, consistindo em cerca de 70%, em média, e contendo juntamente quantidades menores de proteínas, lipídeos e minerais.

Tabela 1. Composição físico-química do melaço de soja.

Componente	Conteúdo em base seca
Carboidratos Totais (g 100 g ⁻¹)	70,4 ± 4,4
Sacarose	30,5 ± 1,7
Rafinose	14,2 ± 1,3
Estaquiose	19,0 ± 1,1
Glicose	1,5 ± 0,0
Frutose	1,8 ± 0,1
Galactose	0,5 ± 0,0
Xilose	2,9 ± 0,1
Umidade (g 100 g ⁻¹)	37,5 ± 0,1
Proteínas (g 100 g ⁻¹)	10,7 ± 0,1
Lipídeos (g 100 g ⁻¹)	7,7 ± 0,1
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	6,8 ± 0,1
Fibras (g 100 g ⁻¹)*	4,4 ± 0,0
Minerais	
Potássio (g kg ⁻¹)	36,50 ± 4,20
Cálcio (g kg ⁻¹)	0,70 ± 0,04
Fósforo (g kg ⁻¹)	0,30 ± 0,02
Magnésio (g kg ⁻¹)	0,27 ± 0,01
Ferro (mg kg ⁻¹)	0,31 ± 0,06
Boro (mg kg ⁻¹)	0,03 ± 0,00
Manganês (mg kg ⁻¹)	0,02 ± 0,00
Cromo (mg kg ⁻¹)	0,01 ± 0,00
Cobalto	n.d.
Cobre	n.d.
Zinco	n.d.
Molibdênio	n.d.

* estimado por diferença.

Os teores de sacarose, rafinose e estaquiose, que correspondem aos principais carboidratos do melaço de soja, foram próximos ao verificado por Siqueira et. al. (2008), cujos valores obtidos foram 28,4%, 9,7% e 18,6%, respectivamente. O alto teor de carboidratos fermentescíveis, principalmente sacarose, torna o melaço de soja um atraente substrato para uso em processos fermentativos. Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose presentes não são utilizados como substrato fermentativo devido ao fato de grande maioria dos microrganismos não produzirem a enzima α -galactosidase, o que diminui o rendimento da fermentação. O aumento do teor de açúcares fermentescíveis pode ser alcançado por meio de hidrólise

enzimática das ligações α -(1 \rightarrow 6)-galactosídicas da rafinose e da estaquiose utilizando a enzima α -galactosidase antes da fermentação, aumentando o rendimento do processo (REIS et al., 2010; ROMÃO et al., 2012). Os elementos potássio, cálcio, fósforo e magnésio constituem, assim como na soja, os principais minerais presentes no melaço (RIAZ, 2006; ÖZCAN; JUHAIMI, 2014). Tais níveis significativos de micronutrientes também contribuem para que o melaço represente uma matéria-prima atraente para o desenvolvimento de microrganismos envolvidos em reações fermentativas. Além dos macronutrientes, como carbono e nitrogênio, os microrganismos necessitam de vários metais, sob a forma de íons inorgânicos, que são requeridos em maior ou menor quantidade, dependendo do elemento, para o seu crescimento. Estes íons desempenham papel biológico, agindo principalmente como ativadores de enzimas, regulador da pressão osmótica e participando da respiração celular (ALTERTHUMM, 2001; MADIGAN et al., 2016).

3.2. Isolamento e caracterização bioquímica dos microrganismos

A tabela 2, a seguir, apresenta as características bioquímicas dos microrganismos isolados.

Tabela 2. Caracterização bioquímica dos microrganismos isolados.

Característica	Microrganismos						
	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07
Bastonetes Gram-negativos	+	+	+	+	+	+	+
Oxidação de etanol a ácido acético	+	+	+	+	+	+	+
Oxidação de ácido acético a CO ₂ e H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+
Oxidação do lactato a CO ₂ e H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+
Produção de catalase	+	+	+	+	+	+	+
Produção de ácido a partir de glicose	+	+	+	+	+	+	+
Produção de celulose	+	+	+	+	+	-	-
Produção de dihidroxiacetona de glicerol	-	-	+	-	-	+	+
Produção de indol do triptofano	-	-	-	-	-	-	-

+ = resultado positivo;

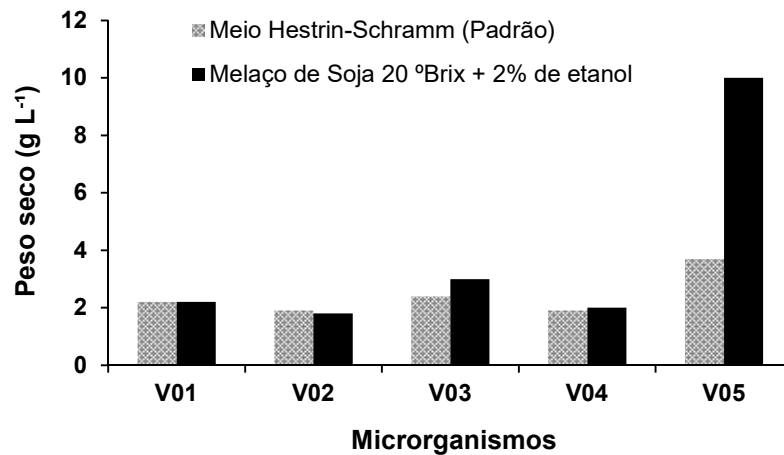
- = resultado negativo.

Foram isolados no total, 7 linhagens de microrganismos a partir de amostras de fermentadores de vinagre industrial, com características morfológicas distintas. Após 72-96 h, as colônias no ágar MYP apresentaram-se de cor branca a amarelada, opacas, e de superfície lisa convexa. Após a realização dos testes bioquímicos, os microrganismos foram classificados como pertencentes aos gêneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter/Komagataeibacter*, com referência a dados constados na literatura (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008; SIEVERS; SWINGS, 2005). Conforme apresentado na Tabela 2, todos os microrganismos apresentaram a capacidade de oxidação do etanol a ácido acético e oxidação do ácido acético e do lactato a CO₂ e H₂O. Todos produziram catalase, ácido a partir de glicose e 71,4% dos isolados produziram celulose. Nenhum isolado produziu indol do triptofano e 42,9% foram capazes de produzir dihidroxiacetona a partir de glicerol. Os dados reportados na literatura em relação à atividade cetogênica (produção de dihidroxiacetona) de bactérias do ácido acético, a partir de glicerol, são variados. Enquanto resultados negativos para culturas isoladas e de referência foram relatados por Fu et al. (2013), Zhao e Yun (2016) e Ohmori (1980), reações positivas foram relatadas nos estudos de Kojima et al. (1998), Son et al. (2002), Toyosaki et al. (1995) e Wee et al. (2011).

3.3. Produção e caracterização da celulose bacteriana e fermentado acético

Entre os microrganismos isolados que apresentaram capacidade de produção de celulose, a cepa V05 foi a que apresentou a maior produção, em peso seco, além dos maiores valores de rendimento e produtividade (Tabela 3). A produção no melaço de soja foi cerca de 3 vezes maior do que a produção obtida no meio HS, de referência, para o mesmo microrganismo (Figura 1). No estudo de Castro et al. (2011), utilizando suco da casca de abacaxi e o meio HS como referência para a produção de celulose bacteriana, também houve aumento da produção no meio a base de casca de abacaxi como substrato. O mesmo também foi observado por Kumbhar et al. (2015) e Fan et al. (2016), ao substituir o meio padrão por casca e bagaço de frutas, e por Jozala et al. (2015), ao utilizar frutas apodrecidas e soro de leite para a produção de celulose. A máxima produção alcançada pela cepa V05 (10 g L⁻¹) foi similar ao obtido por Vazquez et al. (2013), utilizando glicerol remanescente da produção de biodiesel para a produção por *K. xylinus*.

Figura 1. Produção máxima de celulose bacteriana pelos microrganismos V01, V02, V03, V04 e V05.

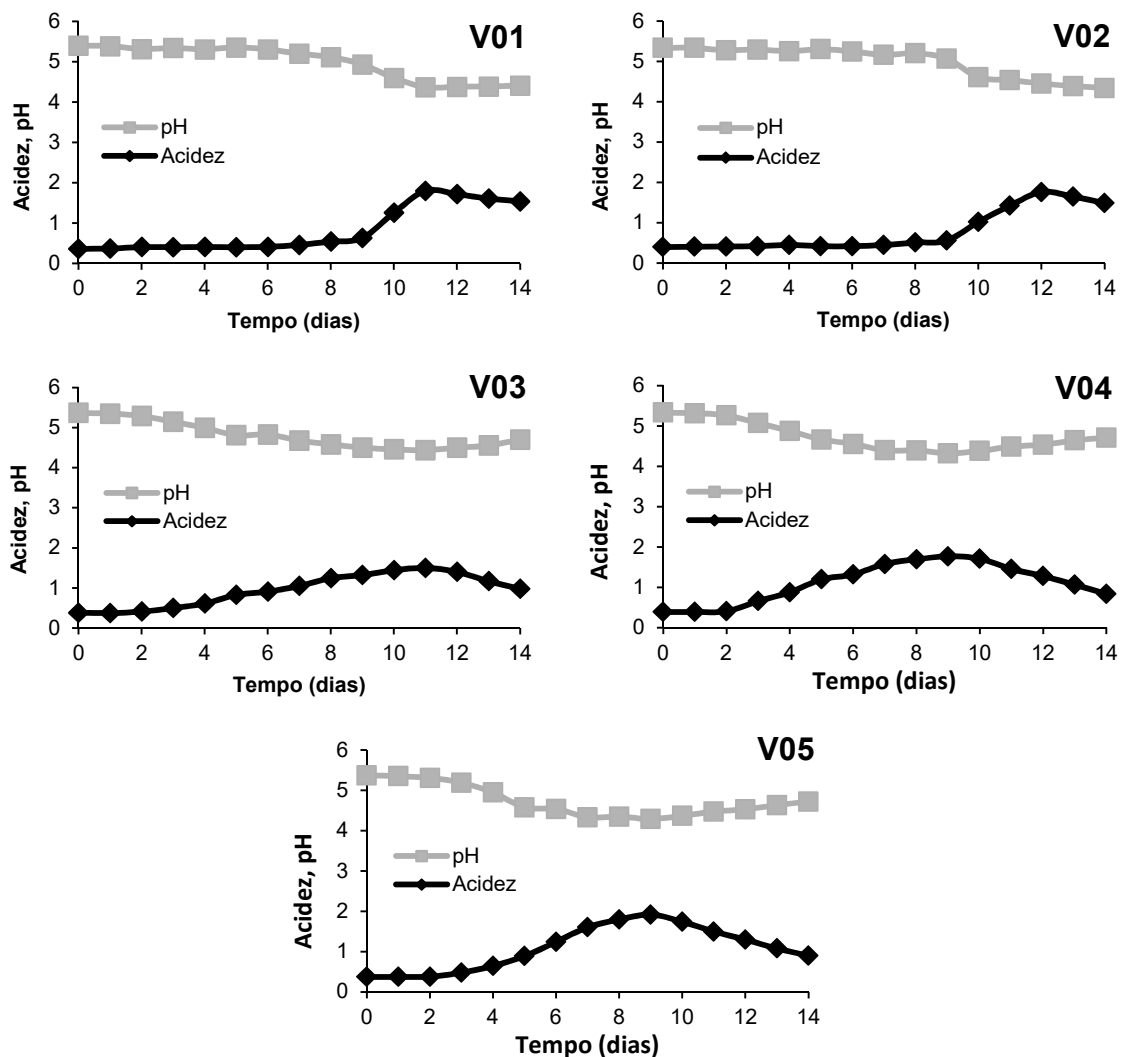


Em testes preliminares, a produção de celulose no melaço de soja sem adição de etanol, utilizando a cepa isolada V01, foi inferior à produção no mesmo meio contendo 2% de etanol e no meio HS (dados não mostrados). Já é conhecido que a adição de etanol em baixas concentrações aumenta a produção de celulose. Em seu trabalho, Li et al. (2012), verificou que a produção por *K. hansenii* aumentou após a adição de 2% de etanol ao meio de cultura sintético utilizado. Segundo os autores, o etanol funciona como uma fonte de energia adicional para a geração de ATP na fase inicial da fermentação atuando como precursor para o crescimento bacteriano e permitindo que a glicose seja utilizada somente para a síntese de celulose (KRYSTYNOWICZ et al. 2002; LI et al., 2012). Heo e Son (2002) e Naritomi et al. (1998) também obtiveram um aumento da produção de celulose com o aumento da concentração de etanol no meio, ocorrendo uma diminuição do rendimento em concentrações de etanol acima de 1,7% e 1,5%, respectivamente. Segundo Naritomi et al. (1998), o aumento na concentração de etanol acima de 1,5% diminuiu a taxa de produção de celulose devido à inibição do crescimento celular em função do acetato gerado, uma vez que síntese de celulose está associada ao crescimento bacteriano.

Além do aumento significativo na produção de celulose, a adição de etanol ao melaço de soja possibilitou a observação do aumento da acidez no meio, uma vez que o etanol é também substrato para a produção de ácido acético. Um decréscimo da acidez, atribuído à superoxidação, foi observado ao longo da fermentação. Durante a fase de oxidação do etanol, as bactérias acumulam o ácido acético no

meio fermentativo sem utilizá-lo, enquanto que durante a fase de superoxidação, a qual ocorre quando o etanol se esgota, elas passam a oxidar o ácido acético em CO_2 e H_2O (GULLO; VERZELLONI; CANONICO, 2014). Esta habilidade é atribuída aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*, e é utilizada para diferenciação do gênero *Gluconobacter*, que não apresenta a mesma capacidade (SENGUN; KARABIYIKLI, 2011; RASPOR; GORANOVIČ, 2008). A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento e decréscimo da acidez e do pH, ao longo da fermentação para os microrganismos estudados. Observou-se um pico máximo de produção de ácido, de 1,9 g/100 mL, no 9º dia de fermentação para o microrganismo V05, que correspondeu a um rendimento máximo de 92,6%. Uma vez que o etanol é também uma fonte de carbono para a síntese de constituintes celulares e pode ser parcialmente perdido por evaporação, o rendimento real é inferior ao valor teórico (GULLO; VERZELLONI; CANONICO, 2014).

Figura 2. Acompanhamento do pH e acidez ao longo da fermentação para os microrganismos V01, V02, V03, V04 e V05.



3.3.1. Consumo de açúcares

A tabela 3 apresenta os resultados de açúcares consumidos durante a fermentação. De um modo geral, os carboidratos rafinose e estaquiase não foram consumidos, sendo os monossacarídeos frutose, glicose e xilose os principais açúcares consumidos. O maior percentual de consumo foi observado para a frutose, com exceção da cepa V05 que apresentou maior consumo de glicose, conforme apresentado na Figura 3. Esse alto consumo de frutose pode estar relacionado com a sua maior concentração no melaço de soja, em comparação com os demais monossacarídeos glicose, xilose e galactose, sendo que este último não foi detectado e quantificado no melaço de soja diluído a 20 °Brix, tanto no tempo final quanto no tempo inicial da fermentação. Frutose também foi descrita por Dahman, Jayasuriya e Kalis (2010) como a fonte de carbono mais adequada para a produção de celulose. Em seus trabalhos, Bae e Shoda (2005) e Zeng, Small e Wan (2011), obtiveram maiores produções de celulose nos meios contendo frutose do que outras fontes de carbono, como glicose e sacarose. Provavelmente, a frutose ativa um sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente em *Acetobacter* sp. o que contribui para a elevada eficiência na utilização deste carboidrato (ZENG; SMALL; WAN, 2011). O baixo consumo de xilose para a síntese de celulose bacteriana foi observado por outros autores, sendo atribuído à complexidade na metabolização deste carboidrato (DAHMAN; JAYASURIYA; KALIS, 2010; ISHIHARA et al., 2002).

3.3.2. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é um processo contínuo, envolvendo a medição do peso da amostra de acordo com o aumento da temperatura na forma de aquecimento programado. Nas análises de TG das membranas verifica-se a existência de três etapas distintas de perda de massa características de celulose bacteriana. O primeiro evento, que vai da temperatura ambiente ($\cong 30$ °C) até aproximadamente 150 °C, é responsável pela perda de massa relacionada à evaporação de água residual do processo de secagem. Na segunda fase, de 250 a 400 °C, as amostras sofrem uma acentuada perda de massa, relacionada à degradação da celulose (desidratação e decomposição das unidades glicosídicas).

Tabela 3. Parâmetros de produtividade e consumo dos açúcares do melaço de soja para os microrganismos estudados.

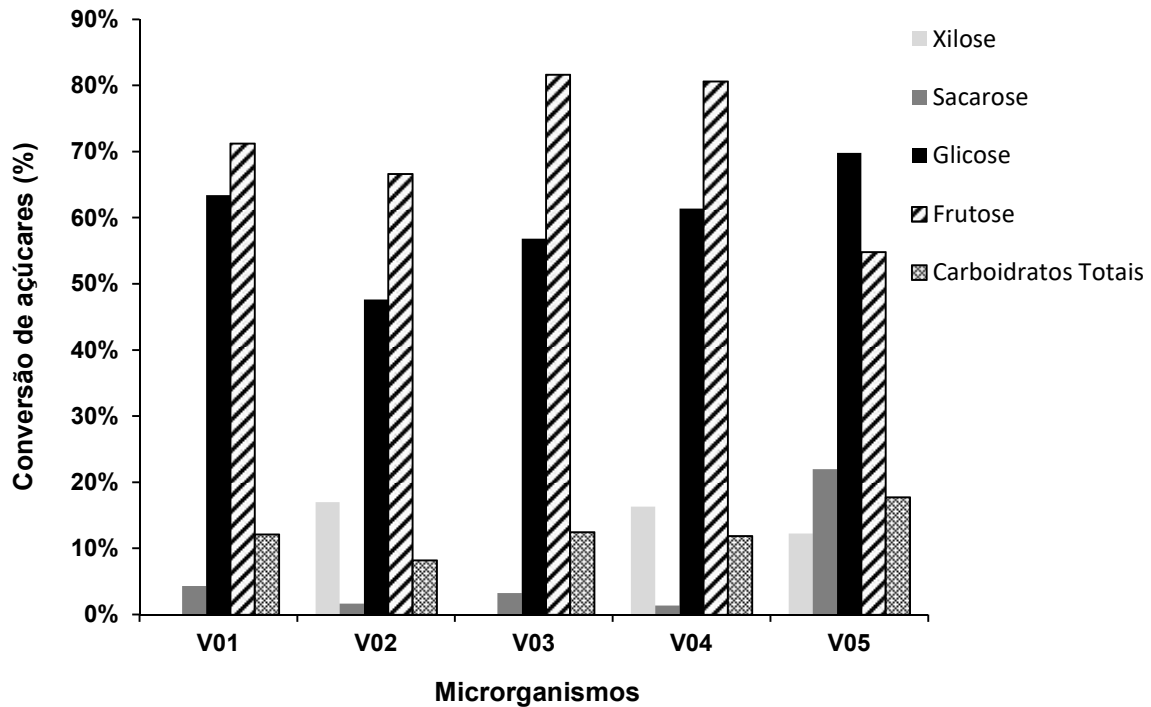
Mo. ¹	Tempo (h)	Consumo de açúcares					Rendimentos		
		Sacarose (g L ⁻¹)	Glicose (g L ⁻¹)	Frutose (g L ⁻¹)	Xilose (g L ⁻¹)	Açúcares Totais ² (g L ⁻¹)	Máxima Produção (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)	R _{ac} . ³ (%)
V01	0	55,8 ± 1,0	4,1 ± 0,1	15,3 ± 2,5	4,4 ± 0,2	133,5 ± 2,2	-	-	-
	336	53,4 ± 12,6	1,5 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,4	117,3 ± 18,4	2,2 ± 0,1	0,0065	13,9
V02	0	61,4 ± 5,3	4,2 ± 0,6	12,6 ± 2,3	5,3 ± 1,6	141,9 ± 13,9	-	-	-
	336	60,4 ± 13,2	2,2 ± 0,5	4,2 ± 1,3	4,4 ± 0,8	130,2 ± 26,9	1,8 ± 0,2	0,0054	14,6
V03	0	61,4 ± 2,3	4,4 ± 0,8	15,8 ± 1,0	4,3 ± 0,1	144,7 ± 7,6	-	-	-
	336	59,4 ± 14,3	1,9 ± 0,5	2,9 ± 0,4	4,3 ± 0,9	126,7 ± 29,8	3,0 ± 0,0	0,0089	17,3
V04	0	58,7 ± 14,4	4,4 ± 0,6	15,5 ± 1,2	4,9 ± 0,4	140,3 ± 27,0	-	-	-
	336	57,9 ± 14,6	1,7 ± 0,7	3,0 ± 0,2	4,1 ± 1,1	123,7 ± 29,6	2,5 ± 0,1	0,0074	14,9
V05	0	70,1 ± 4,5	5,3 ± 0,6	16,6 ± 1,9	4,9 ± 0,3	164,4 ± 11,4	-	-	-
	336	54,7 ± 12,7	1,6 ± 0,3	7,5 ± 0,5	4,3 ± 0,7	135,2 ± 13,4	10,0 ± 0,5	0,0298	34,7

¹ Microrganismos utilizados.

² Total de açúcares incluindo os carboidratos rafinose e estaquiose não consumidos durante a fermentação.

³ Rendimento em relação aos açúcares consumidos: sacarose, glicose, frutose e xilose.

Figura 3. Percentual de conversão dos açúcares consumidos no melaço de soja após a fermentação.



A terceira e última fase se estende até 500 °C e corresponde à degradação termo-oxidativa da celulose, seguido da formação de um resíduo carbonizado. Os dados de TGA dependem de vários fatores, como geometria da amostra, massa, compatibilidade e taxa de aquecimento (GEORGE et al., 2005; GEORGE et al., 2011). A Tabela 4 apresenta os dados de “ T_{onset} ” (temperatura de degradação térmica inicial), “ $T_{10\%}$ ” (temperatura em que se perde 10% em peso da massa da amostra), porcentagem de perda de massa a 600 °C e a porcentagem de resíduo a 550 °C, para as diferentes membranas de celulose produzidas. As membranas que apresentaram maior degradação térmica foram as V01CP (produzida no meio HS, de referência) e V01MEL (produzido no meio a base de melaço de soja). As menores diferenças de “ T_{onset} ” entre as membranas produzidas nos diferentes meios foram observadas para as amostras V01 e V02. As demais membranas apresentam maior diferença de temperatura para este parâmetro. A amostra V05CP foi a que apresentou a maior temperatura para o início da degradação térmica (T_{onset}), o que pode estar correlacionado com a maior uniplanaridade presente nessas membranas e ao maior índice de cristalinidade, necessitando de maior energia para sua degradação.

Figura 4. Curvas de TGA das membranas de celulose bacteriana produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL).

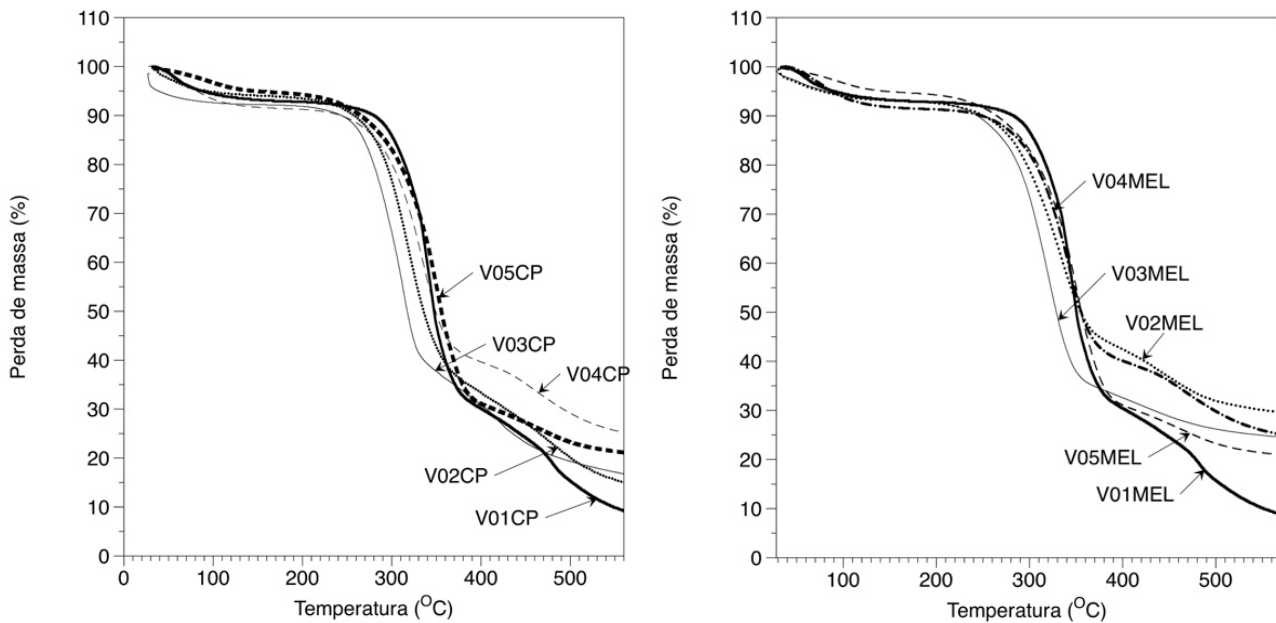


Tabela 4. Resultados das análises termogravimétrica e difração de raios-x: Parâmetros de T_{onset} , $T_{10\%}$, perda de massa a 600 °C (%), resíduo a 550 °C (%) e grau de cristalinidade das membranas de celulose.

Amostra	T_{onset} ¹ (°C)	$T_{10\%}$ ² (°C)	Perda de massa em 600 °C (%)	Resíduo em 550 °C (%)	I.C. (%) ³
V01CP	288,8	276,0	92,50	9,80	63,9
V01MEL	286,4	280,5	89,90	7,60	58,3
V02CP	279,6	258,5	86,90	15,65	50,5
V02MEL	277,8	251,9	70,43	30,90	50,5
V03CP	270,1	244,2	83,48	17,08	66,7
V03MEL	288,0	244,5	75,38	24,96	64,3
V04CP	292,9	247,5	75,94	25,62	64,0
V04MEL	300,5	282,0	78,46	22,50	61,4
V05CP	307,0	266,7	79,40	21,37	71,6
V05MEL	299,3	280,4	78,46	22,40	69,0

¹ Temperatura de degradação térmica inicial.

² Temperatura em que se perde 10% em peso da massa.

³ Índice de cristalinidade.

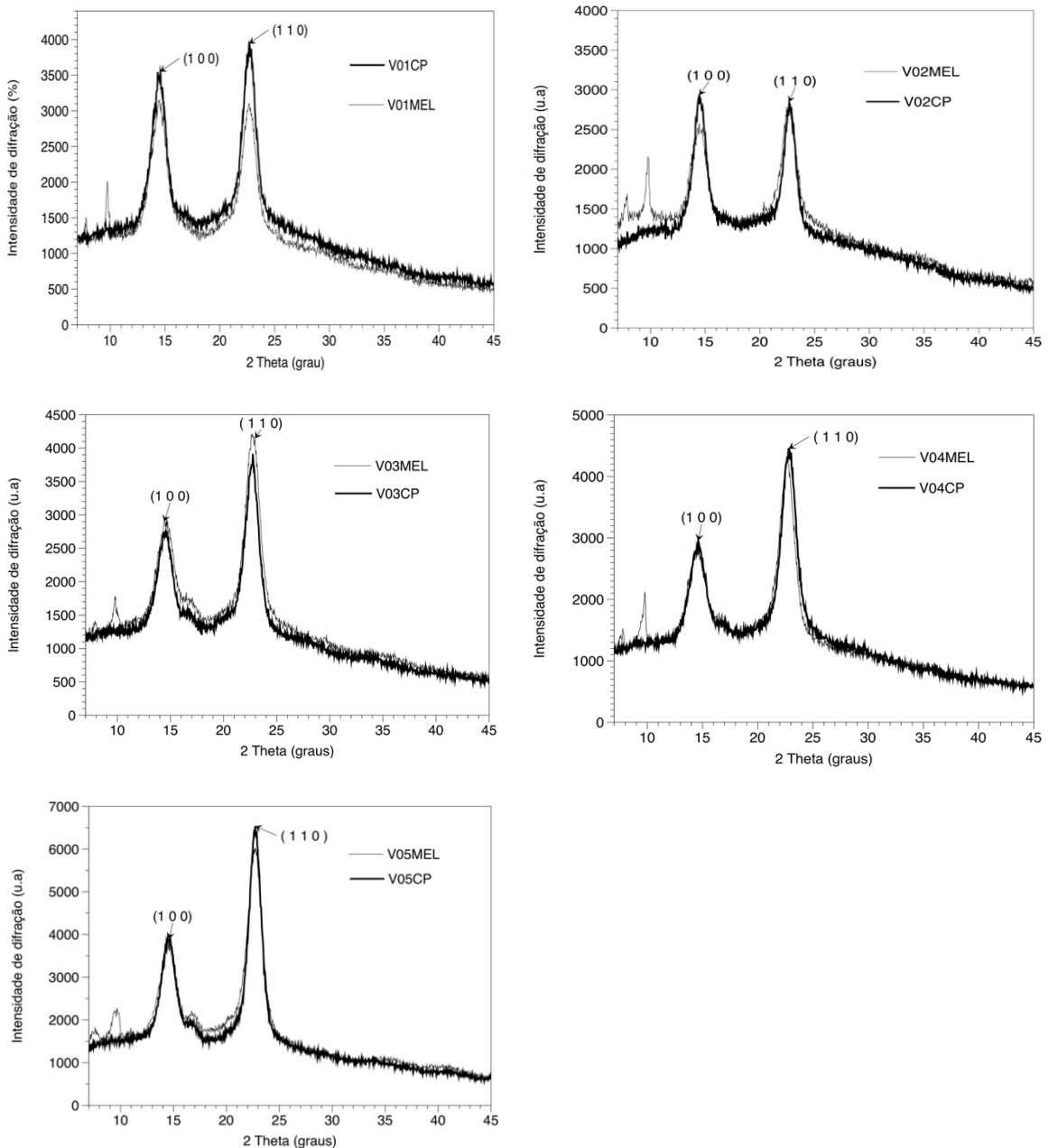
CP = caldo HS de referência (padrão).

MEL = melaço de soja.

3.3.3. Análise de difração de raios-X

As análises de difração de raio-x demonstraram que quanto ao grau de cristalinidade o meio de cultivo não influenciou de maneira significativa na organização cristalina das membranas. Porém, como a celulose α e β coexistem nas fibras, pode-se observar que o meio de cultivo influenciou na proporção dos alomorfos nas celulosas (Figura 5).

Figura 5. Difratomogramas de difração de raios-x das membranas de celulose produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL).



Entre as características mais importantes da celulose estão suas excelentes propriedades mecânicas, decorrentes da sua estrutura cristalina (LIMA et al., 2011). As membranas produzidas tanto no meio de referência (HS) como no meio a base de melaço de soja, neste trabalho, apresentaram perfis cristalinos semelhantes, como mostrado na Figura 5 e Tabela 4. Conforme observado, as amostras apresentaram dois picos principais em 14,4 e 22,5 graus. Cada pico apresenta contribuições correspondentes às fases I α e I β . Nestes picos há sobreposição das reflexões dos planos 100_{I α} , 110_{I β} , e 010_{I α} em 14,4° e sobreposição dos planos 110_{I α} e 200_{I β} em 22,5°. Dessa forma pode-se observar que as membranas V02CP e V02MEL apresentaram intensidades semelhantes de ambos os picos. De maneira distinta as demais membranas produzidas apresentaram diminuição do pico em 14,4° e aumento do pico em 22,5°. Essa diferença de intensidade dos picos pode ser avaliada de duas maneiras. Levando em consideração o alomorfo principal presente na celulose bacteriana (celulose I α), a menor intensidade da reflexão do plano em 100_{I α} revela um aumento da uniplanaridade dos ribbons de celulose nas membranas, o que se traduz de maneira efetiva na maior cristalinidade nas membranas VO5CP e V05MEL. Por outro lado, considerando a coexistência de ambos os alomorfos I α e I β pode-se sugerir que houve um aumento da proporção de celulose I β nas membranas produzidas nos meios HS, de referência, e no meio a base de melaço de soja. Além disso, as variações na intensidade dos picos podem estar relacionadas com pequenas diferenças na orientação das cadeias nas amostras (CASTRO et al., 2011).

3.3.4. Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

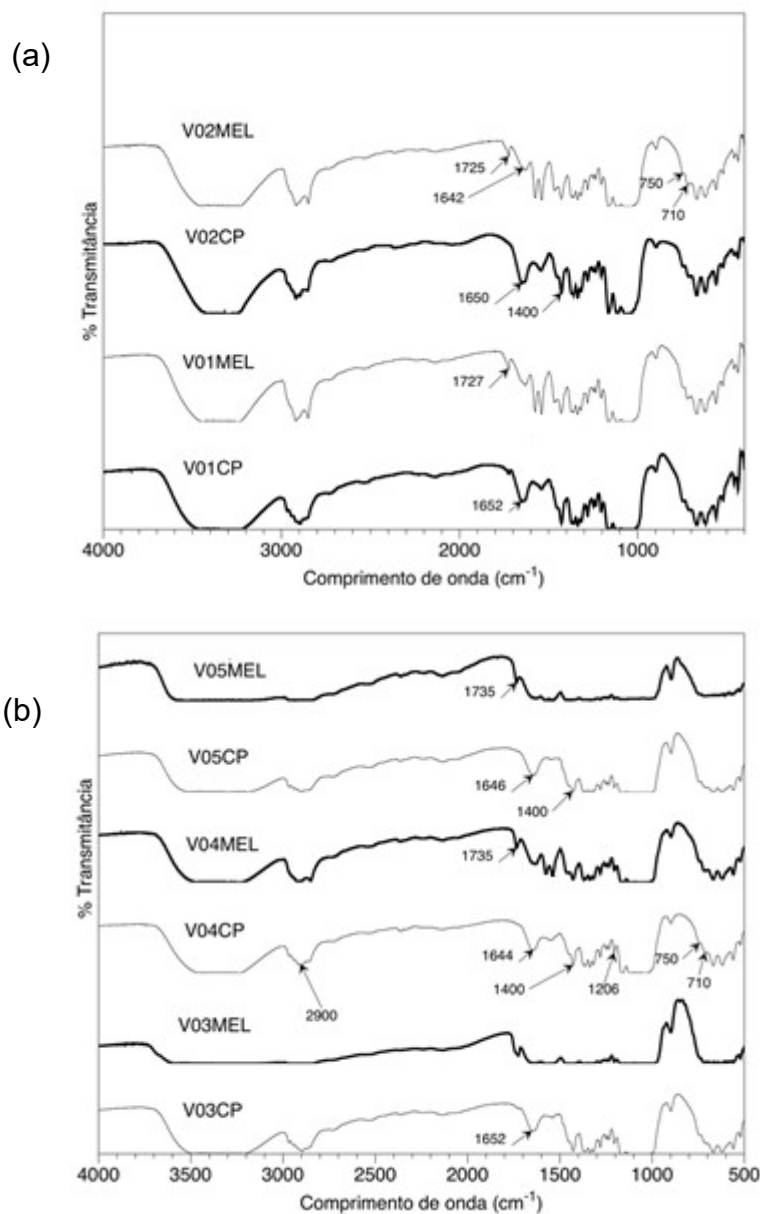
A Figura 6 apresenta as bandas obtidas por Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho para as membranas de celulose.

Como as membranas formadas foram bastante grossas, as análises de FT-IR feitas com os filmes saturaram e quando foi tentado fazer a pastilha com KBr não foi possível misturar a membrana com o sal.

As principais atribuições que caracterizam o polímero de celulose são: estiramento OH em 3500 cm⁻¹, estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico CH₂ em 2900 cm⁻¹, estiramento simétrico CH₂ em 2700 cm⁻¹, deformação OH em

1600 cm^{-1} , deformação CH_2 em 1400 cm^{-1} , deformação CH_3 em 1370 cm^{-1} , deformação OH em 1340 cm^{-1} e deformação CO em 1320-1030 cm^{-1} (ZHABANKOV, 1966; SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991; KONDO, 1997; KAČURÁKOVÁ et al., 2002). As bandas observadas em 1640 cm^{-1} (δ s HOH) e 3500 cm^{-1} (ν OH) são atribuídas à absorção de água dos compósitos. A banda que aparece em 750 cm^{-1} corresponde a fase I α e a banda em 710 cm^{-1} corresponde a fase I β da celulose (WADDA; OKANO, 2001).

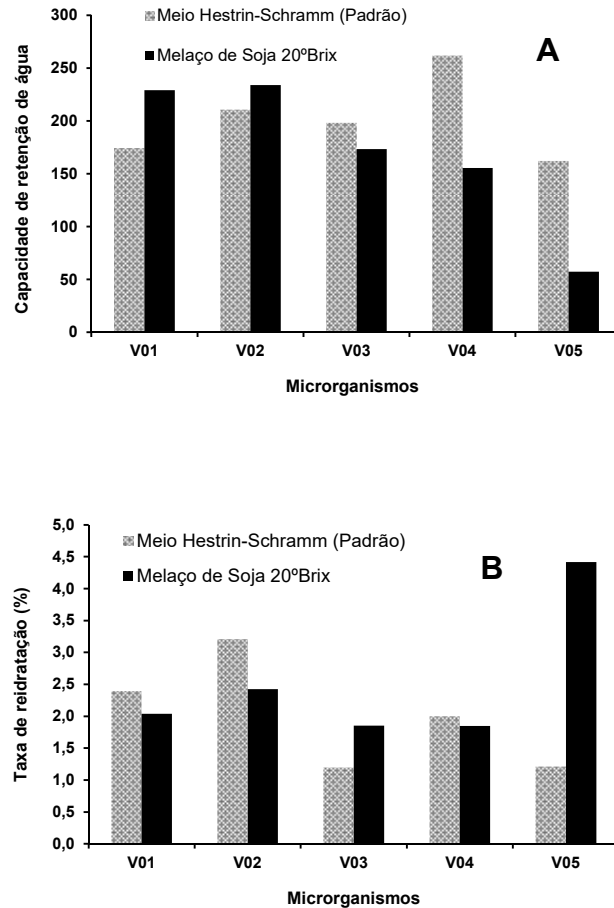
Figura 6. Resultados de FT-IR das membranas de celulose produzidas em meio HS de referência (CP) e no melado de soja (MEL) pelos microrganismos V01 e V02 (a) e V03, V04 e V05 (b).



3.3.5. Propriedades hidrofílicas

A capacidade de retenção de água representa a massa de água retida por unidade de peso seco da celulose. Esse parâmetro está diretamente envolvido nas aplicações biomédicas da celulose como um curativo, por exemplo, o conteúdo de umidade apropriado do material curativo acelera o processo de cicatrização de feridas e protege contra a contaminação. Além disso, facilita a penetração de substâncias ativas na ferida, permitindo a regeneração mais facilmente sem danificar a pele recém-formada (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012). A Figura 7 apresenta a caracterização das membranas de celulose produzidas no meio HS (referência) e no melaço de soja em relação à capacidade de retenção de água e taxa de reidratação. A membrana de celulose produzida no meio à base de melaço de soja pela cepa V05 (V05MEL) exibiu a menor capacidade de retenção de água, cerca de 60 vezes o seu peso seco, enquanto o maior valor foi observado para a membrana V02MEL, cerca de 230 vezes o seu peso seco. Os fatores que interferem nas propriedades hidrofílicas das membranas são vários, entre eles: o método de secagem utilizado, que pode causar modificações estruturais nas membranas, como rugosidade, encolhimento e colapso de algumas estruturas (ZENG; LAROMAINE; ROIG, 2014; AMIN; ABADI; KATAS, 2014), a porosidade das membranas, uma vez que a existência de um maior número de espaços vazios entre as fibrilas de celulose permite que mais água seja absorvida pelo material (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012), a cristalinidade das membranas (HUANG et al., 2010; CHEN et al., 2011) e o aumento de grupos polares (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006). No presente trabalho, observou-se que a redução da cristalinidade causou um aumento na capacidade de retenção de água, conforme observado também por outros autores (GOTO; YOKOE, 1996; WATANABE et al., 1998). Esse fato pode estar relacionado com o aumento de regiões amorfas na estrutura que proporcionam mais espaço para acomodação das moléculas de água, promovendo a permeação da água para a rede de celulose (HUANG et al., 2010). A amostra V05MEL apresentou a maior taxa de reidratação entre as amostras, o que demonstra uma maior facilidade em recuperar a água removida no processo de secagem. Uma vez que essa amostra apresentou-se mais espessa em relação às demais, o aumento de grupos OH, mais hidrofílicos, na estrutura, podem ter aumentado a capacidade adsorção de água tanto na superfície quanto dentro da matriz de celulose.

Figura 7. Capacidade de retenção de água (a) e taxa de reidratação (b) das membranas de celulose bacteriana produzidas.



3.3.6. Análise de Variância (ANOVA)

As tabelas 5, 6 e 7 apresentam os resultados do teste de Tukey para as médias de máxima produção, capacidade de retenção de água e taxa de reidratação das membranas de celulose produzidas em meio HS de referência (CP) e no melaço de soja (MEL), pelos microrganismos isolados utilizados neste trabalho. A análise estatística demonstrou que a cepa isolada V05 apresentou diferença significativa, em relação aos demais microrganismos, na produção de celulose bacteriana tanto no melaço de soja quanto no meio de referência. A produção por esta bactéria no melaço de soja foi cerca de 3, 4, 4,5 e 5,5 vezes maior que a produção pelas cepas V03, V04, V01 e V02, respectivamente.

Tabela 5. Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas produzidas pelos microrganismos no melaço de soja (MEL).

Amostra	Máx. Produção (g L ⁻¹)*	C.R.A. ^{1,*}	T.R. ^{2,*}
V01MEL	2,2 ^{c,d} ± 0,1	229,0 ^{a,b} ± 47,3	2,0 ^b ± 0,8
V02MEL	1,8 ^d ± 0,2	233,8 ^a ± 8,5	2,4 ^b ± 0,7
V03MEL	3,0 ^b ± 0,0	173,2 ^{b,c} ± 16,4	1,9 ^b ± 0,6
V04MEL	2,5 ^{b,c} ± 0,1	155,6 ^c ± 10,1	1,8 ^b ± 0,4
V05MEL	10,0 ^a ± 0,5	57,5 ^d ± 1,4	4,4 ^a ± 0,2

* médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

¹ Capacidade de retenção de água.

² Taxa de reidratação (%).

Tabela 6. Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas produzidas pelos microrganismos no meio HS de referência (CP).

Amostra	Máx. Produção (g L ⁻¹)*	C.R.A. ^{1,*}	T.R. ^{2,*}
V01CP	2,2 ^b ± 0,1	174,2 ^b ± 26,6	2,4 ^{a,b} ± 0,3
V02CP	1,9 ^b ± 0,1	210,5 ^{a,b} ± 34,0	3,2 ^a ± 1,5
V03CP	2,4 ^b ± 0,3	198,1 ^b ± 10,1	1,2 ^b ± 0,2
V04CP	1,9 ^b ± 0,3	261,6 ^a ± 27,4	2,0 ^{a,b} ± 0,4
V05CP	3,7 ^a ± 0,2	162,1 ^b ± 1,7	1,2 ^b ± 0,1

* médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

¹ Capacidade de retenção de água.

² Taxa de reidratação (%).

Tabela 7. Teste de Tukey para os valores médios das características das membranas entre os substratos utilizados pelos microrganismos (melaço de soja – MEL e meio HS de referência – CP).

Amostra	Máx. Produção (g L ⁻¹)*	C.R.A. ^{1,*}	T.R. ^{2,*}
V01MEL	2,2 ^a ± 0,1	229,0 ^a ± 47,3	2,0 ^a ± 0,8
V01CP	2,2 ^a ± 0,1	174,2 ^b ± 26,6	2,4 ^a ± 0,3
V02MEL	1,8 ^a ± 0,2	233,8 ^a ± 8,5	2,4 ^a ± 0,7
V02CP	1,9 ^a ± 0,1	210,5 ^a ± 34,0	3,2 ^a ± 1,5
V03MEL	3,0 ^a ± 0,0	173,2 ^a ± 16,4	1,9 ^a ± 0,6
V03CP	2,4 ^b ± 0,3	198,1 ^a ± 10,1	1,2 ^a ± 0,2
V04MEL	2,5 ^a ± 0,1	155,6 ^b ± 10,1	1,8 ^a ± 0,4
V04CP	1,9 ^b ± 0,3	261,6 ^a ± 27,4	2,0 ^a ± 0,4
V05MEL	10,0 ^a ± 0,5	57,5 ^b ± 1,4	4,4 ^a ± 0,2
V05CP	3,7 ^b ± 0,2	162,1 ^a ± 1,7	1,2 ^b ± 0,1

* médias na mesma coluna seguidas de letras iguais, dentro de cada subdivisão, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

¹ Capacidade de retenção de água.

² Taxa de reidratação (%).

As características de capacidade de retenção de água e taxa de reidratação das membranas V05MEL também se mostraram significativamente diferentes das demais membranas, o que demonstra que as diferentes linhagens de bactérias podem apresentar diferentes perfis de produção de celulose, além de as membranas produzidas por elas poderem apresentar características estruturais distintas.

O melaço de soja influenciou de forma significativa na produção de celulose para as cepas V03, V04 e V05, sendo esta última a que apresentou aumento mais acentuado na produção (2,7 vezes), enquanto as demais, V03 e V04, demonstraram um aumento de 1,3 vezes. Em relação às características hidrofílicas, o uso do melaço de soja influenciou de forma significativa na capacidade de retenção de água das membranas produzidas pelas cepas V01, V04 e V05, e na taxa de reidratação das membranas V05. Provavelmente, o tipo de substrato também influencia na estrutura e propriedades das membranas.

Essas diferenças estruturais das membranas apenas demonstram diferentes propriedades e características que podem ser aproveitadas em diferentes aplicações das membranas, não sendo um parâmetro de qualidade das mesmas.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível o isolamento de bactérias do ácido acético capazes de produzir celulose bacteriana a partir de uma indústria produtora de vinagres. O melaço de soja utilizado como substrato fermentativo, com adição de etanol, mostrou-se adequado para a produção deste biopolímero em conjunto com ácido acético, pelos microrganismos estudados. Por ser um meio complexo, contendo alta quantidade de carboidratos, além de proteínas e minerais, o melaço de soja mostrou-se ser uma matéria-prima adequada para a biossíntese e com possibilidade de fornecer maiores rendimentos de fermentação, comparado ao meio de referência Hestrin-Schramm (HS), padrão para a produção de celulose. O meio a base de melaço de soja utilizado influenciou de forma significativa na produção proporcionando um aumento do rendimento para três microrganismos estudados.

Os microrganismos mostraram variação na capacidade de síntese de celulose e ácido, e nas propriedades das membranas de celulose produzidas, demonstrando que essas características podem variar de uma espécie para outra.

A cepa V05 apresentou alto rendimento na produção de celulose a partir de melaço de soja e as membranas produzidas apresentaram maior cristalinidade, menor capacidade de retenção de água e maior taxa de reidratação.

O tempo de fermentação de aproximadamente 10 dias, em condições estáticas, foi mais adequado, uma vez que além desse período pode ocorrer a oxidação do ácido acético pelos microrganismos após o esgotamento do etanol.

5. REFERÊNCIAS

- AMIN, M. C. I. M.; ABADI, A. G.; KATAS, H. Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 180-189, jan. 2014.
- ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. In.: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: Fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1. p. 1-32.
- ANDRÉS-BARRAO, C.; SAAD, M. M.; CHAPPUIS, M.-L.; BOFFA, M.; PERRET, X.; PÉREZ, R. O.; BARJA, F. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 6, p. 1701-1717, mar. 2012.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 19th ed. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012.
- BAE, S. O.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 45-51, abr. 2005.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60-70, jun. 2008.
- BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E138-E143, jun. 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, ago. 1959.
- ÇAKAR, F.; ÖZER, I.; AYTEKIN, A. Ö.; ŞAHİN, F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 7-13, jun. 2014.

- 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 from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, ago. 2011.
- CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96-102, fev. 2011.
- CHEN, H.-H.; CHEN, L.-C.; HUANG, H.-C.; LIN, S.-B. In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus*. **Cellulose**, v. 18, n. 6, p. 1573-1583, dez. 2011.
- CHEN, L.; HONG, F.; YANG, X.-X.; HAN, S.-F. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464-468, maio 2013.
- CIRIGLIANO, M. C. A Selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 1038-1039, maio 1982.
- DAHMAN, Y.; JAYASURIYA, K. E.; KALIS, M. Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1647-1659, nov. 2010.
- ENTANI, E.; OHMORI, S.; MASAI, H.; SUSUKI, K.-I. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. **Journal General Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 475-490, 1985.
- FAN, X.; GAO, Y.; HE, W.; HU, H.; TIAN, M.; WANG, K.; PAN, S. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p.1068-1072, out. 2016.
- FU, L.; CHEN, S.; YI, J.; HOU, Z. Effects of different fermentation methods on bacterial cellulose and acid production by *Gluconacetobacter xylinus* in Cantonese-style rice vinegar. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 5, p. 321-331, jun. 2013.
- GAO, Y.; LI, D.; LIU, Y. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1165-1172, set. 2012.
- GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 189-194, dez. 2005.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; BAWA, A. S. SIDDARAMAIAH. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50-57, jan. 2011.

GOMES, F. P.; SILVA, N. H. C. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; DUARTE, M. F.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; FREIRE, C. S. R. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205-211, ago. 2013.

GOTO, M.; YOKOE, Y. Ammoniation of barley straw. Effect on cellulose crystallinity and water-holding capacity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, n. 3-4, p. 239-247, maio 1996.

GULLO, M.; VERZELLONI, E.; CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1571-1579, out. 2014.

HEO, M.-S.; SON, H.-J. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 41-45, ago. 2002.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemistry Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-342, out. 1954.

HUANG, H.-C.; CHEN, L.-C.; LIN, S.-B.; HSU, C.-P.; CHEN, H.-H. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6084-6091, ago. 2010.

HONG, F.; GUO, X.; ZHANG, S.; HAN, S.-F.; YANG, G.; JÖNSSON, L. J. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 503-508, jan. 2012.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISHIHARA, M.; MATSUNAGA, M.; HAYASHI, N.; TIŠLER, V. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 986-991, dez. 2002.

JAHAN, F.; KUMAR, V.; RAWAT, G.; SAXENA, R. K. Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1157-1171, jul. 2012.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA JÚNIOR, A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181-1190, fev. 2015.

KOJIMA, Y.; TONOUCI, N.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; YAMADA, Y. The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidans* subsp. Nov. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 185-187, 1998.

KAČURÁKOVÁ, M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J.; WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145-1153, 2002.

KONDO, T. The assignment of IR absorption bands due to free hydroxyl groups in cellulose. **Cellulose**, v. 4, p. 281-292, dez. 1997.

KRYSTYNOWICZ, A.; CZAJA, W.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; GONÇALVES-MISKIEWICZ, M.; TURKIEWICZ M.; BIELECKI, S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 189-195, out. 2002.

KUMBHAR, J. V.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6677-6691, ago. 2015.

KUO, C.-H.; CHEN, J.-H.; LIOU, B.-K.; LEE, C.-K. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 98-103, fev. 2016.

LI, Y.; TIAN, C.; TIAN, H.; ZHANG, J.; HE, X.; PING, W.; LEI, H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1479-1487, dez. 2012.

LIMA, G. M.; SIERAKOWSKI, M.-R.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Characterisation of bacterial cellulose partly acetylated by dimethylacetamide/lithium chloride. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 190-197, mar. 2011.

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; LI, R.; LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113-119, jan. 2014.

LONG, C. C.; GIBBONS, W. R. Conversion of soy molasses, soy solubles, and dried soybean carbohydrates into ethanol. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 6, n. 1, p. 62-68, mar. 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

NARITOMI, T.; KOUUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production in continuous culture from fructose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 6, p. 598-603, 1998.

OHMORI, S.; MASAI, H.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2901-2906, 1980.

ÖZCAN, M. M.; JUHAIMI, F. A. Effect of sprouting and roasting processes on some physico-chemical properties and mineral contents of soybean seed and oils. **Food Chemistry**, p. 337-342, v. 154, jul. 2014.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

RASPOR, P.; GORANOVIČ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101-124, 2008.

REIS, A. P.; GUIMARÃES, V. M.; FERREIRA, J. G.; QUEIROZ, J. H.; OLIVEIRA, M. G. A.; FALKOSKI, D. L.; ALMEIDA, M. N.; REZENDE, S. T. Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soy molasses by α -galactosidases and Invertase from *Aspergillus terreus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 719-729, maio/jun. 2010.

RIAZ, M. N. **Soy Applications in Food**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 288 p.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 4, p. 2310-2316, mar. 2012.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 647-656, maio 2011.

SIEVERS, M.; SWINGS, J. Family II. Acetobacteraceae. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. 2nd. ed. New York: Springer, 2005. v. 2.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J.-L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, nov. 2008.

SON, C.; CHUNG, S.; LEE, J.; KIM, S. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 722-728, 2002.

SPINOSA, W. A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. 1996. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1996.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. 2002. 244 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

SUGIYAMA, J.; PERSSON, J.; CHANZY, H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. **Macromolecules**, v. 24, n. 9, p. 2461-2466, abr. 1991.

TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 257-265, abr. 2010.

TOYOSAKI, H.; KOJIMA, Y.; TSUCHIDA, T.; HOSHINO, K.-I.; YAMADA, Y.; YOSHINAGA, F. The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. Nov. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 307-314, 1995.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596-603, abr. 2012.

VAZQUEZ, A.; FORESTI, M. L.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545-554, jun. 2013.

WADDA, M.; OKANO, T. Localization of I α and I β phases in alga cellulose revealed by acid treatments. **Cellulose**, v. 8, n. 3, p. 183-188, set. 2001.

WATANABE, K.; TABUCHI, M.; MORINAGA, Y.; YOSHINAGA, F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187-200, set. 1998.

WEE, Y.-J.; KIM, S.-Y.; YOON, S.-D.; RYU, H.-W. Isolation and characterization of a bacterial cellulose producing bacterium derived from the persimmon vinegar. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 72, p. 16267-16276, nov. 2011.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455-4469, dez. 2014.

ZENG, X.; SMALL, D. P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 506-513, jun. 2011.

ZHABANKOV, R. G. **Infrared spectra of cellulose and its derivatives**. New York: Consultants Bureau, 1966. 333 p.

ZHAO, H.; YUN, J. Isolation, identification and fermentation conditions of highly acetoin-producing acetic acid bacterium from Liangzhou fumigated vinegar in China. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 279-288, mar. 2016.

CONCLUSÃO GERAL

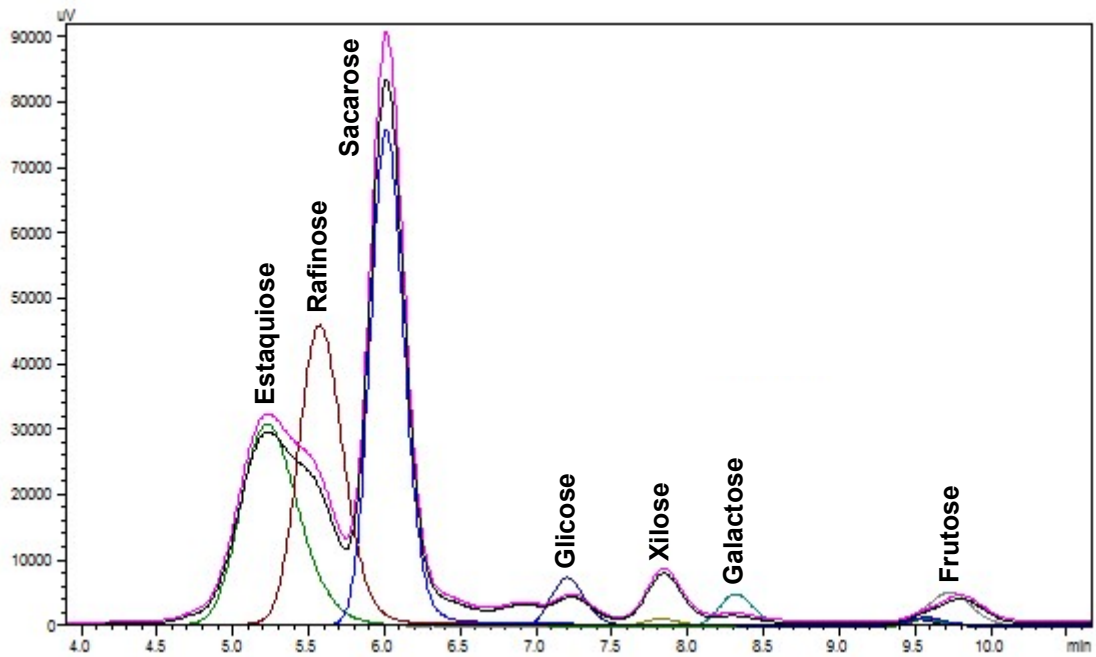
Foi possível o isolamento de cinco espécies de bactérias caracterizadas bioquimicamente como pertencentes aos gêneros de bactérias do ácido acético, a partir de indústria de vinagres, que apresentaram capacidade de produção de celulose. A caracterização físico-química do melaço de soja mostrou que o mesmo apresenta alta quantidade de açúcares fermentescíveis, passíveis de serem utilizados por microrganismos, além de proteínas e minerais.

A fermentação do melaço de soja proporcionou um aumento na capacidade de síntese de celulose bacteriana, em relação à produção no meio de referência para a biossíntese, juntamente com a produção simultânea de ácido acético, pelos microrganismos estudados.

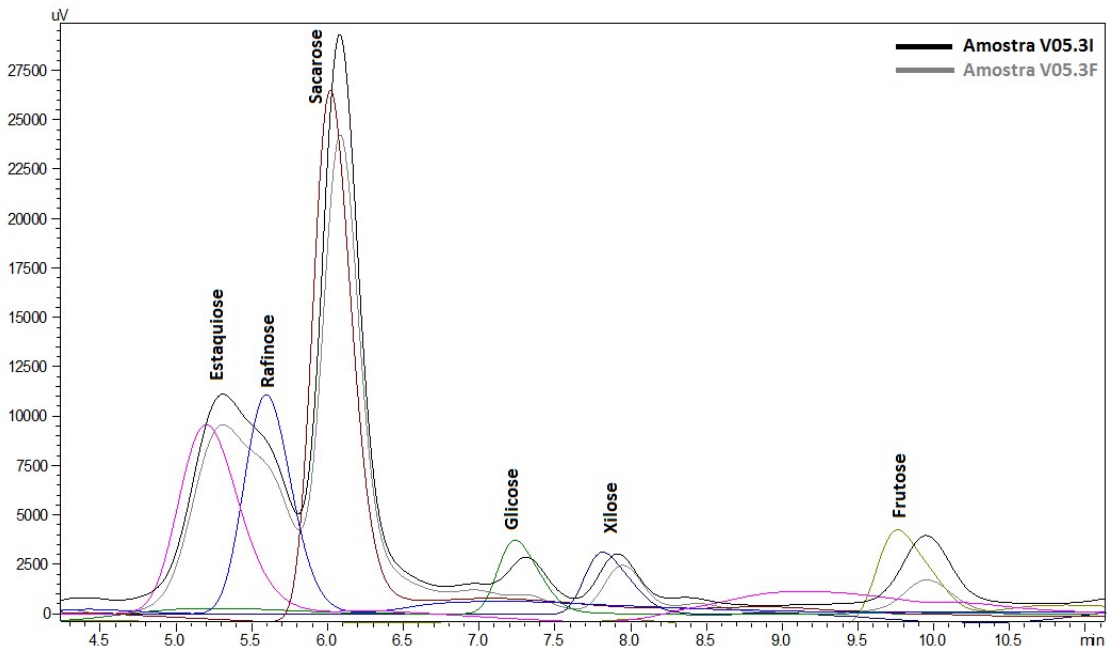
As membranas produzidas no melaço de soja mostraram variação nas características hidrofílicas, entre os microrganismos produtores, demonstrando que diferentes linhagens de bactérias apresentam diferentes capacidades de síntese de celulose e as membranas produzidas por eles podem apresentar diferentes propriedades intrínsecas.

ANEXOS

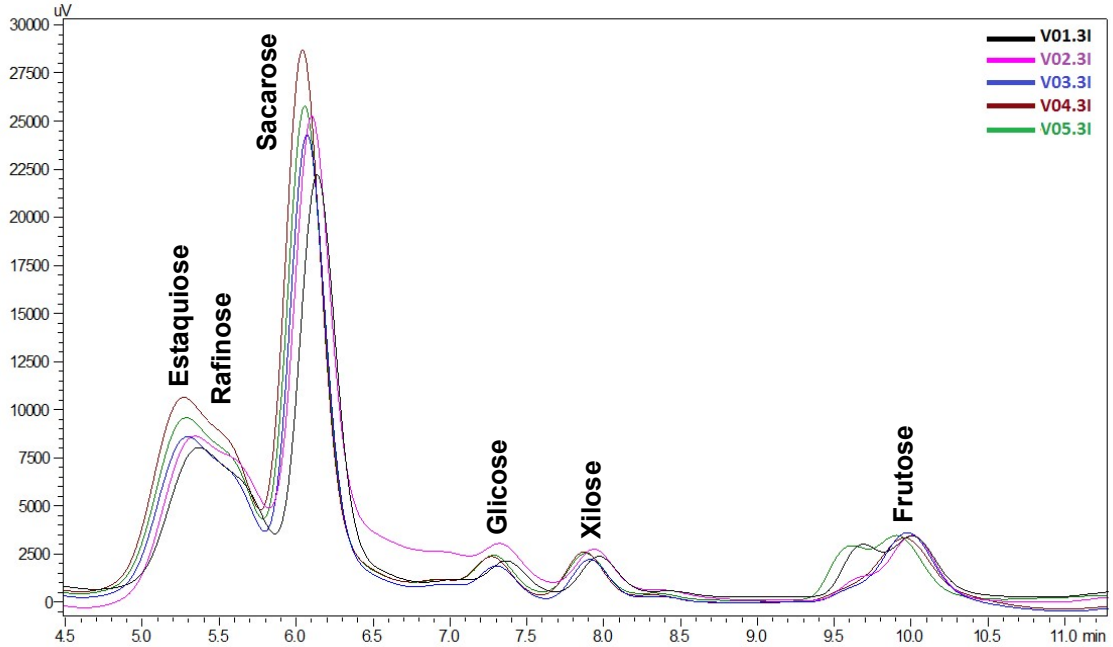
- Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos do melão de soja.



- Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos do melão de soja antes e após a fermentação (amostra V05 – tempo inicial e final).



- Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos do melão de soja não fermentado (amostras V01, V02, V03, V04 e V05 – tempo inicial).



- Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos do melão de soja fermentado (amostras V01, V02, V03, V04 e V05 – tempo final).

