



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCIELLE LINA VIDOTTO

**PRODUÇÃO DE CELULOSE E PERFIL DOS METABÓLITOS
DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO ÀS
FONTES GLUCOSE E SACAROSE POR
*Gluconacetobacter xylinus***

FRANCIELLE LINA VIDOTTO

**PRODUÇÃO DE CELULOSE E PERFIL DOS METABÓLITOS
DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO ÀS
FONTES GLUCOSE E SACAROSE POR
*Gluconacetobacter xylinus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial necessário à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

Londrina
2015

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

Vidotto, Francielle Lina.

PRODUÇÃO DE CELULOSE E PERFIL DOS METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO ÀS FONTES GLUCOSE E SACAROSE POR *Gluconacetobacter xylinus* / Francielle Lina Vidotto. - Londrina, 2015.
71 f. : il.

Orientador: Cesar Augusto Tischer.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Gluconacetobacter xylinus* - Teses. 2. Celulose Bacteriana - Teses. 3. Metabolitos - Teses. 4. Glicerol - Teses. I. Tischer, Cesar Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

FRANCIELLE LINA VIDOTTO

**PRODUÇÃO DE CELULOSE E PERFIL DOS METABÓLITOS DE
FERMENTAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO ÀS FONTES
GLUCOSE E SACAROSE POR
*Gluconacetobacter xylinus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial necessário à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de dezembro de 2015.

*A Deus, pois tudo foi criado por meio
Dele e para Ele.*

*Aos meus amados pais Mauro e
Francismeire e minha irmã Francelise pelo
incentivo, apoio e amor em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina e ao programa de pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade da realização deste trabalho;

Ao meu orientador professor Dr. Cesar Augusto Tischer, pelos ensinamentos, confiança e pela amizade.

A minha banca de qualificação prof. Doumit e prof. Josiane pela participação da banca e contribuições com o trabalho final.

Aos professores e colegas do Mestrado, e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial para minha amiga Talita B. Martins por toda ajuda e apoio na realização deste trabalho.

A toda me minha família por encherem meus dias de alegria mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo Guilherme pela paciência, incentivo e carinho em todos os momentos.

*Onde estiverem os vossos bens
mais preciosos, certamente aí também
estará o vosso coração.*

Lucas 12:34

VIDOTTO, Francielle Lina. **Produção de celulose e perfil dos metabólitos de fermentação de glicerol associado as fontes glucose e sacarose por *Gluconacetobacter xylinus***. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015

RESUMO

A celulose bacteriana é dotada de propriedades físicas únicas, incluindo uma rede de fibra ultrafina altamente cristalina. Grande esforço tem sido dedicado a melhorar a produção biotecnológica de celulose e reduzir os custos de produção. A produção de celulose associada ao glicerol é de interesse por este ser o principal subproduto da produção de biodiesel. Devido à sua ampla ocorrência na natureza, muitos microrganismos podem utilizar glicerol como fonte de carbono e energia, desta forma este têm atraído a atenção para o uso na bioconversão do glicerol. Para a biossíntese de celulose utilizou-se a cepa de *Gluconacetobacter xylinus*, pertencente a família Acetobacteraceae. São cepas estritamente aeróbicas e executam a oxidação incompleta de vários açúcares e alcoóis. Os meios cultivados foram de Hestrin-Schramm modificado, associando glicerol as fontes glucose e sacarose e variando suas concentrações: glucose 8 %, glicerol 1 % / glucose 2 %, glicerol 2 % / glucose 4 % e glicerol 2 % / sacarose 8 %. As fermentações foram realizadas estaticamente a temperatura de 28 °C, por um período de 10 dias. Nos dias 4, 7 e 10 avaliou-se o pH, a formação de membrana, cristalinidade e a produção de outros metabólitos. O maior rendimento de membrana foi no meio contendo glucose, gly1+glu2, no dia 10 de fermentação com 3,5 g %. A associação com glicerol resultou na produção de celulose, porém o tempo necessário para obter um rendimento notável é maior do que a glicose como único substrato. Através de RMN em estado sólido obteve-se a cristalinidade das membranas, onde houve uma clara tendência para uma maior cristalinidade nas membranas com 7 dias de fermentação, variando entre 67,6 IC% a 79 IC%. Os produtos do metabolismo encontrados nos meios por análise de espectroscopia de RMN em estado líquido foram similares, com destaque para a produção de alanina e lactato que estiveram presente em todos os meios. A leucina e a treonina estiveram presentes em diversos meios, ainda em pequenas quantidades foi encontrado glutamato, valina, aspartato, lisina propileno glicol e diidroxicetona, os dois últimos foram observados apenas no meio contendo sacarose. Desta forma os resultados mostraram que o glicerol pode ser associado a outras fontes de carbono e que futuramente podem ser realizados testes com o glicerol resíduo do biodiesel, para obtenção de membranas de celulose reduzindo o custo de produção.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Glicerol. Metabólitos. *Gluconacetobacter xylinus*.

VIDOTTO, Francielle Lina. **Production of cellulose and profile of glycerol fermentation metabolites associated glucose and sucrose sources by *Gluconacetobacter xylinus***. 2015. 71p. Dissertation (Master's of Biotechnology) – University State of Londrina, Londrina. 2015

ABSTRACT

Bacterial cellulose is endowed with unique physical properties, including a network of highly crystalline ultrafine fiber and high purity. Much effort has been devoted to improving the biotechnological production of pulp and reduce production costs. The production of glycerol linked cellulose is of interest which is the main by-product of biodiesel production. Because of its widespread occurrence in nature, many microorganisms can of course use glycerol as a source of carbon and energy, so these have drawn attention the use of glycerol bioconversion. For the cellulose biosynthesis used to *Gluconacetobacter xylinus* strain, which belongs to family Acetobacteraceae. They are strictly aerobic strains and performing incomplete oxidation of various sugars and alcohols. The cultured media were Hestrin-Schramm modified, associating glycerol sources glucose and sucrose and varying their concentration: glucose 8 %, glycerol 1 % / glucose 2 %, glycerol 2 % / glucose 4 % e glycerol 2 % / sucrose 8 %. The fermentations were performed statically at a temperature of 28⁰C for a period of 10 days. On days 4, 7 and 10 was evaluated pH, membrane formation, crystallinity and the production of other metabolites. The results showed a higher yield of membrane in the medium containing glucose, gly 1 + glu2 on 10 fermentation of 3.5 g %. The association with glycerol results in the production of pulp, but the time necessary for obtaining a remarkable yield is higher than glucose as the sole substrate. Through solid-state NMR gave the crystallinity of the membranes, where there was a clear trend toward higher crystallinity membranes with 7 days of fermentation ranging from 67.6 IC % to 79 IC %. Metabolic products found in the media by analysis of NMR spectroscopy in liquid form were similar, especially for the production of alanine and lactate that were present in all media. The leucine and threonine were present in various media, although in small quantities has been found glutamate, valine, aspartate, lysine and diidroxicetona propylene glycol, the latter two were only observed in medium containing sucrose. Thus the results show that glycerol may be associated with other carbon sources which can further be carried out tests with the glycerol residue of biodiesel, to obtain cellulose membranes with low production cost

Keywords: Bacterial cellulose. Glycerol. Metabolites. *Gluconacetobacter xylinus*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição de massa dos meios para produção de celulose bacteriana variando concentração e presença de glicerol, sacarose e glucose.33
- Tabela 2** - Relação massa total de carbono adicionada nos meios com a massa de membrana obtida para cada meio.39
- Tabela 3** – Índice de cristalinidade das membranas nos meios de cultivo com glicerol.42
- Tabela 4** - Valores percentuais relativos de fontes de carbono adicionadas para cada meio e dos metabólitos observados por ^1H rmn em relação ao tempo em dias. Na última coluna observa-se os valores de pH para cada dia e meio.48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática da transesterificação na produção de biodiesel.	21
Figura 2 -	Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por <i>G. xylinus</i> a partir das fontes de carbono glucose e glicerol.	24
Figura 3 -	Início da via bioquímica para a produção de celulose bacteriana por <i>G. xylinus</i> a partir da hidrólise da sacarose em frutose e glucose.	25
Figura 4 -	Estrutura linear da celulose com ligações de ponte de hidrogênio.	26
Figura 5 -	Rendimentos das fontes glucose, glicerol para análise (P.A), sacarose e glicerol resíduo no 10 ^o dia de fermentação.	36
Figura 6 -	Variação do pH em função do tempo de fermentação dos processos fermentativos estáticos com <i>G. xylinus</i>	38
Figura 7 -	Filmes de celulose bacteriana formados após 4, 7 e 10 dias.	40
Figura 8 -	Relação massa total de carbono adicionada nos meios com a massa de membrana obtida para cada meio.	41
Figura 9 -	Relação entre o índice de cristalinidade das membranas obtidas nos diferentes meios de cultura.	43
Figura 10 -	Espectroscopia de ¹³ C-RMN celulose bacteriana.	44
Figura 11 -	Espectroscopia de ¹³ C-RMN celulose bacteriana produzida em meio gly2+sac8 em 10 dias de fermentação.	45
Figura 12 -	Quantificação da concentração de glucose α do meio gly2+glu4, observados por ¹ H rmn respectivamente nos dias 4 (91,8 %), 7 (73,7 %) e 10 (55,6 %) dia de fermentação.	47
Figura 13 -	Quantificação da concentração de alanina nos meios de cultura no 4 ^o dia de fermentação, observados por ¹ H rmn.	48
Figura 14 -	Quantificação da concentração de aspartato no meio gly2+glu4 observado por ¹ H rmn no 7 ^o dia de fermentação.	48
Figura 15 -	Quantificação da concentração de valina do meio gly2+glu4 e gly1+glu2 observados por ¹ H rmn respectivamente nos dias 7 (1,3 %) e 10 (1,7 %) de fermentação.	49

Figura 16 - Quantificação da concentração de lactato nos meios de cultura no 7 de 10 dia de fermentação, observados por ^1H rmn.	50
Figura 17 – Projeções da produção de metabólitos pelo meio glu8 nos dia 4, 7 e 10.	51
Figura 18 – Projeções da produção de metabólitos pelo meio gly2+glu4 nos dias 4, 7 e 10.....	52
Figura 19 – Projeções da produção de metabólitos pelo meio gly1+glu2 nos dias 4, 7 e 10.....	53
Figura 20 – Projeções da produção de metabólitos pelo meio glu2+sac8 nos dias 4, 7 e 10.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CB	Celulose Bacteriana
G	<i>xylinus</i> – <i>Gluconacetobacter xylinus</i>
IC	Índice de cristalinidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN C13 CP-MAS	Ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico.
rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
	Objetivo Geral	16
	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Caracterização da <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	17
3.2	Processos Fermentativos e o Meio de Cultura.....	19
3.3	Biossíntese de Celulose.....	22
3.4	Produtos da Fermentação.....	25
3.4.1	<i>Celulose Bacteriana</i>	25
3.4.2	<i>Metabólitos</i>	29
3.5	Caracterização Química e Física das Membranas.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Material	31
4.1.1	<i>Glicerol, sacarose e glucose</i>	31
4.1.2	<i>Cepa bacteriana</i>	31
4.1.3	<i>Meios de cultura</i>	31
4.2	Métodos Biológicos	31
4.2.1	<i>Manutenção do microrganismo</i>	31
4.2.2	<i>Produção de celulose bacteriana</i>	32
4.3	Métodos químicos	33
4.3.1	<i>Tratamento da celulose</i>	33
4.4	Métodos Físicos	33
4.4.1	<i>Massa da celulose bacteriana</i>	33
4.4.2	<i>Processamento meio de cultura</i>	34
4.4.3	<i>Cálculo do rendimento da membrana</i>	34
4.4.4	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	34
4.4.5	<i>Cálculo do índice de cristalinidade por Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	35

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Testes Preliminares.....	36
5.2	Variação do pH	37
5.3	Formação de Membrana e Rendimento.....	39
5.4	Análise por ressonância magnética nuclear no estado sólido (CP MAS ¹³ C rmn) das membranas de celulose bacteriana	42
5.5	Análise de metabólitos por ressonância magnética nuclear de estado líquido (¹ H rmn)	45
5.6	Análise de Componente Principal (ACP).....	51
5.7	Processamento dos espectros de RMN de 1H e extração dos dados	54
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A celulose, (1-4)- β -D-glucano, é o polímero não ramificado composto por dezenas de unidades de glucose lineares arranjadas em paralelo, formando ligações de hidrogênio intra e inter cadeia altamente regulares. É vastamente distribuída na natureza, sendo produzida principalmente por plantas vasculares, grande parte de sua biossíntese ocorre na parede celular das plantas, sendo associada à lignina, hemiceluloses e outros componentes (NABE et al, 1979; DELMER; AMOR, 1995; KLECHKOVSKAYA et al., 2003; ZHONG et al., 2013).

Além das plantas, diversos organismos distribuídos nos reinos biológicos são capazes de produzir este exopolímero, como bactérias, fungos, protistas e tunicados. A celulose bacteriana produzida é quimicamente pura, livre de componentes, tais como lignina e hemicelulose. A retirada destes componentes por processos químicos encarecem o processo industrial, assim a celulose bacteriana apresenta vantagens. É extremamente hidrofílica com maior capacidade de absorver água se comparada com a celulose originada das plantas e tem significativamente um maior grau de polimerização, além de poder ser produzida em diferentes substratos e obter diferentes formas. É dotada de propriedades físicas únicas tais como rede de fibra ultrafina altamente cristalina e de alta pureza, por conseguinte, é um material biológico com potencial de uso industrial. Essas propriedades aliadas a estrutura tridimensional nanométrica confere um amplo leque de aplicações que vão desde a indústria de papel e têxtil até a indústria alimentícia do polímero (HESTRIN; SCHEAMM, 1954; LIN et al., 1985; LEE et al., 2001; KIMURA et al., 2001; D'ARGENIO; MILLER, 2004 KLEMM et al. 2006).

Dentre as bactérias a espécie *Gluconacetobacter xylinus* é conhecida como a maior produtora, este organismo bem como seu produto foram identificados por Brown em 1986. A *G. xylinus* é gram-negativa, pode crescer e produzir celulose a partir de diversos substratos. Uma vantagem distinta no estudo é que suas fibrilas de celulose são um produto metabolicamente inerte, altamente puro e de depósito extracelular (BROWN, 1886; JONAS; FARAH, 1998; KESHK; SAMESHIMA, 2005; MIKKELSEN et al., 2009).

Para produção de celulose diversas fontes de carbono podem ser utilizadas, alguns substratos vêm sendo estudados tais como, manitol, glicerol, frutose, sacarose e galactose em busca de se obter melhores rendimentos e características

das fibras celulose. Na busca da utilização de substratos de baixo custo, o glicerol é uma opção, sendo este o principal subproduto da produção de biodiesel e disponível em abundância. O glicerol é uma boa fonte de carbono e de energia para o crescimento de vários microrganismos, podendo ser adequado para a produção biotecnológica de diversos produtos químicos em processos fermentativos (HELLER et al., 1980; WANG et al., 2001; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; ZHONG et al., 2013).

Além da produção de celulose a bioconversão dos substratos gera também diversos metabólitos tais como diidroxicetona, propanodiol, succinato, citrato, butanodiol, lactato, aminoácidos entre outros (NABE et al., 1979; ZHU et al., 2008; ZHANG et al., 2010) .

Desta forma, estudos têm sido dedicados a melhorar a produção biotecnológica de celulose, por meio de testes de estirpes selecionadas, diferentes formas de fermentação e diferentes formulações. Assim, o objetivo do trabalho foi testar a associação do glicerol com fontes de glucose e sacarose, a fim de obter rendimento em celulose e análise dos metabólitos formados durante a fermentação. Para a caracterização dos produtos obtidos durante a fermentação, técnicas como o RMN ^{13}C CP-MAS em estado líquido e sólido foram utilizadas. (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; CHENG et al., 2002; MOOSAVI-NASAB, 2011).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Produzir, pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, celulose e caracterizar os principais metabólitos formados pela fermentação do glicerol associado às fontes de glucose e sacarose.

Objetivos Específicos

- Produzir meios de cultura com concentrações diversificadas das associações entre glicerol, glucose e glicerol;
- Quantificar o rendimento em celulose dos meios durante o processo de fermentação;
- Calcular a cristalinidade das celulosas formadas;
- Caracterizar os metabólitos presentes no meio de fermentação;
- Realizar um manual para processamento de espectros de RMN de ^1H ;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Caracterização da *Gluconacetobacter xylinus*

A bactéria *G. xylinus* pertencente à família Acetobacteriaceae, do gênero *Acetobacter* foi descrita pela primeira vez por Brown (1886) como *Acetobacter xylinum* e reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus* baseado no sistema ubiquinona e sequências do gene 16S rRNA. Essas bactérias são comumente encontradas na superfície de plantas, frutas e flores e na microbiota secundária de material vegetal em decomposição, estando envolvidas na acidificação de sucos de frutas e bebidas alcoólicas (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997; SPINOSA, 2002)

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são bactérias que apresentam morfologia de bastonetes, alongados, retos ou ligeiramente curvos com tamanho variando entre 0,6-0,6 x 1,0-4,0 μm , podendo ou não ser móveis. São bactérias não patogênicas, gram-negativas, estritamente aeróbias e não fotossintetizantes. A faixa de temperatura ideal para as culturas é de 28 - 30 °C, sendo que sua morte térmica ocorre entre 65 a 70 °C. São tolerantes as condições ácidas, onde o pH do meio de cultura pode variar entre 4,0 a 6,0, sendo o pH ótimo dependente da estirpe produtora (BROWN, 1986; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; KLEMM et. al., 2005).

Para o crescimento da *G. xylinus* e produção de celulose, o meio de cultura deve ser composto por hidratos de carbono, que são as fontes de carbono essenciais para a síntese de CB, extrato de levedura, fonte de nitrogênio e ainda peptona. Os períodos de incubação para produção de CB dependem do sistema de cultivo, a cultura com agitação ocorre em períodos de 24 a 72 horas, já a cultura estática é caracterizada pelos longos períodos de cultura, variando de uma a duas semanas (WATANABE et al., 1998; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

O processo de produção de CB por *G. xylinus* é constituído por 3 etapas: polimerização dos resíduos de glicose em cadeias-glucana, secreção extracelular das cadeias lineares e organização das cadeias glucanas. O resultado desse

processo é a formação de uma estrutura tridimensional resistente, a microfibrila (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2005).

Segundo estudos, a bactéria *G. xylinus* produz celulose como subproduto do seu metabolismo e como mecanismo de defesa ao ambiente. A membrana formada pela fermentação atua como barreira física para proteger a bactéria da radiação ultra-violeta. Mais de 23% das células das bactérias de *G. xylinus* cobertas por CB sobreviveram a um tratamento com radiação ultravioleta durante 1h de irradiação, sendo que a remoção da membrana provocou uma diminuição nas células, com apenas 3% de sobrevivência. A CB ainda serve de barreira impedindo que fagos e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular, aumenta a capacidade de colonizar substratos e permite a retenção de umidade prevenindo a desidratação do substrato (WILLIAMS; CANNON, 1989; KRYSZYNOWICZ et al., 2005).

O interesse pela celulose produzida por essa bactéria é crescente por esta apresentar propriedades físicas únicas, como rede de fibras ultra-fina, alta pureza e cristalinidade elevada, além do fato de serem microrganismos que produzem quantidades consideráveis de CB a partir de diferentes fontes de carbono (YOSHINAGA et al., 1997; CHAWLA et al., 2009).

O crescimento celular e a produção de celulose são mecanismos que ocorrem em paralelo competindo assim pelos mesmos nutrientes fornecidos ao microrganismo, porém a produção de celulose consome apenas cerca de 10% da energia gerada não interferindo nos processos anabólicos que ocorrem no meio intracelular (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Um dos problemas para a exploração comercial da biossíntese de CB é a mutação espontâneas de cepas de *G. xylinus* que resultam em células não produtoras de celulose, alguns métodos de cultura estão mais propensos a esse tipo de mutação. As cepas não produtoras de celulose são conhecidas como CEL⁻ e foram descritas pela primeira vez por Schramm e Hestrin (1954). As células foram distinguidas pela morfologia das colônias e eficiência de síntese de celulose, levando a três tipos de células de *G. xylinus*. A tipo I são células produtoras de celulose (CEL⁺), a tipo II as não produtoras (CEL⁻), mas capazes de reverter e a tipo III são não produtoras (CEL⁻) incapaz de reverter (SON et al., 2001).

A frequência de CEL⁺ e CEL⁻ são dependentes das condições do cultivo, pois comparado o cultivo estático e agitado, o agitado promove a formação de CEL⁻

mutantes, resultando em uma significativa redução da síntese de CB. Uma comparação entre os perfis proteicos revelou que as CEL⁻ não são capazes de sintetizar duas enzimas chave envolvidas nas últimas etapas da biossíntese de celulose, sendo elas a fosfoglucomutase e UDP-glucose fosforilase (KRYSTYNOWICZ et al., 2005).

3.2 Processos Fermentativos e o Meio de Cultura

Para que um processo fermentativo seja industrialmente viável é indispensável definir o microrganismo a ser utilizado, o meio de cultura, as condições de agitação e aeração mais adequadas, a temperatura e o pH ideal para o microrganismo em questão. A produção biotecnológica da celulose pode ocorrer em fermentações submersas agitadas e estáticas, a celulose produzida por estes processos são estruturalmente semelhantes, porém elas diferem no seu formato, na em esferas ou filmes respectivamente. A escolha do método depende do destino final da celulose (HORNUNG; LUDWIG; SCHMAUDER, 2007; LIU et al., 2015).

As culturas submersas são aeradas por agitação e ocorrem em biorreatores ou em frascos com agitação, o período de incubação da cultura agitada varia de 24 a 72 horas para produção de CB. Períodos longos de uma a duas semanas, são características de culturas estáticas que ocorrem em estufas bacteriológicas. As aparências dos dois tipos de celulose produzidas são bastante diferentes, sendo que em cultura estática forma-se uma membrana de celulose espessa e gelatinosa na superfície do meio de cultura, em contraste na fermentação agitada a celulose aparece como partículas de vários tamanhos e várias formas dispersas no meio de cultura (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; KRYSTYNOWICZ et al., 2005).

A produção de CB em cultivo estático possui a vantagem de ser um método simples e de baixo custo, no entanto apresenta algumas desvantagens que podem dificultar o processo, como o controle e padronização do inóculo, o monitoramento da temperatura e pH e determinação da quantidade de oxigênio dissolvido no meio. Para produções em larga escala as culturas agitadas apresentam maior produtividade e curto prazo de tempo de produção. Porém a escolha do método depende muito da aplicação final da CB (HESTRIN; SCHRAMM 1954; KRYSTYNOWICZ et al., 2005; CHAWLA et al., 2009).

Além dos métodos fermentativos a atividade da estirpe e a composição do meio de cultura também são fatores fundamentais que afetam a produção e a rentabilidade da CB. O meio de fermentação deve conter fonte de carbono, nitrogênio e outros macro e micronutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. As mudanças nos componentes do meio afetam o crescimento e a formação do produto diretamente ou indiretamente. A secreção de exopolissacarídeos é geralmente mais perceptível quando são fornecidas as bactérias, uma fonte de carbono e nitrogênio em abundância (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

As fontes de carbono são indispensáveis para as bactérias, pois através delas os microrganismos obtêm energia para seu metabolismo. A fonte de carbono mais utilizada na produção de CB é a glucose, porém estudos relatam que meios contendo sacarose, frutose, manitol, glicerol, lactose e resíduos agroindústrias também levam a produção de CB. A principal fonte de nitrogênio para o crescimento de *G. xylinus* é o extrato de levedura. Como agente tamponador é utilizado fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000; HEO; SON, 2002).

Todas as bactérias produtoras de celulose são capazes de converter glicose à celulose como parte de seu metabolismo. Neste caso, a glucose atua não somente como fonte de energia, mas também como precursora da biossíntese do biopolímero. A glucose, como fonte de carbono, é facilmente transportada através da membrana celular e incorporada na via biossintética de celulose. Porcentagens de consumo da glucose por *G. xylinus* em processo estático de até 99% são obtidos com 4 dias de fermentação, sendo 19 % de glucose é incorporada CB e 40 % convertida a ácido glucônico (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; ZHONG et al., 2013).

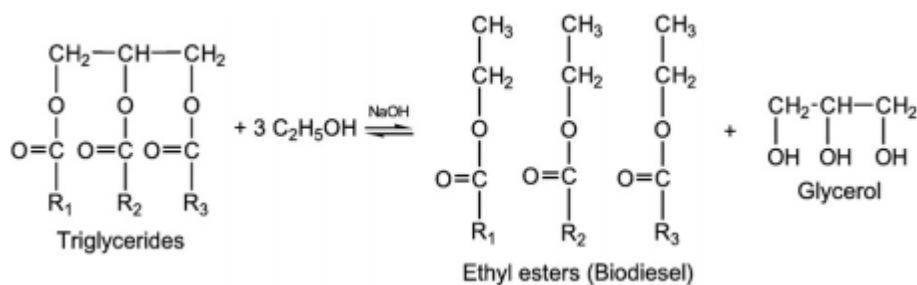
O uso da glucose como substrato para a produção de CB encontra limitações, pois a fermentação da glucose resulta na formação do ácido glucônico como subproduto, o que acarreta na diminuição do pH e na diminuição da produção de CB, além de seu alto custo para grandes escalas de produção (TODA et al., 1997; ZHONG et al., 2013).

Diversos estudos utilizam sacarose como fonte de carbono, está nem sempre é a melhor fonte para produção de CB. Em estudo realizado por Mikkelsen (2009) com *G. xylinus* em meio Hestrin-Schramm, diante das diversas fontes testadas, glucose, galactose, glicerol, manitol e frutose, o meio contendo sacarose apresentou

um baixo rendimento nas primeiras 46 horas de fermentação, apenas após as 96 horas de fermentação é que se obteve rendimento elevado. Isto sugere que o processo de conversão é mais lento pelo fato da sacarose não poder ser transportada através da membrana celular antes de ser hidrolisada no periplasma em glucose e frutose (NGUYEN; GIDLEY; DYKES, 2008; MIKKELSEN et al., 2009).

Outro substrato com potencial estudo é o glicerol (1,2,3-propanotriol), que atualmente encontra-se em abundância por ser principal subproduto da produção de biodiesel (Figura 1) (WANG et al., 2001).

Figura 1 - Representação esquemática da transesterificação na produção de biodiesel.



Devido à sua ocorrência na natureza, muitos microrganismos conhecidos podem, naturalmente, utilizar glicerol como única fonte de carbono e energia, desta forma estes microrganismos têm atraído a atenção para o potencial uso de bioconversão, que agrega um valor significativo para a produtividade da indústria de biodiesel. É uma fonte de carbono nova abundante e promissora para microbiologia industrial, oferece a possibilidade de obtenção de diversos produtos químicos, com rendimentos mais elevados do que aqueles obtidos usando açúcares (WEINHOUSE et al., 1976; SILVA et al., 2009).

Seis fontes de carbono, glucose, manitol, glicerol, frutose, sacarose, e galactose, foram testados para a produção de celulose por *G. xylinus* (ATCC 53524). A estirpe bacteriana foi cultivada em meio de Hestrin e Schramm (HS) e as fontes de carbono foram modificadas por simples substituição, com o pH inicial dos meios de 5. Os experimentos conduzidos a mais de 96 h indicaram que a utilização de glicerol e glucose proporcionaram melhores rendimentos de produção comparada com as outras fontes, e estas não apresentaram diferença quanto à caracterização estrutural. Ao final do processo de fermentação foi consumido 85% de glicerol e

desse valor 47,96% foi incorporado a CB, supõem-se que os outros 37,08% sejam de metabólitos gerados por este processo. Em termos de rendimentos metabólicos o glicerol foi o que apresentou os maiores valores de CB sendo de 14,7 g/mol (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; ZHONG et al., 2013).

Outra vantagem da produção de CB a partir do glicerol é a elevada resistência a tração e baixa porosidade. O glicerol também teve o maior índice de cristalinidade comparado com as outras fontes, resultado que indica que a presença de glicerol favorece o processo de cristalização e reduz as regiões amorfas da CB. Sua microestrutura densa de CB obtida a partir do glicerol pode ser usada em aplicações biomédicas, uma vez que resulta em uma superfície lisa, que melhora a aderência e a proliferação de células endoteliais, além de servir como uma eficiente barreira física contra a infecção externa (BODIN et al. 2007; MIKKELSEN et al., 2009; ZHONG et al., 2013).

O glicerol é uma boa fonte de carbono e de energia para o crescimento de vários microrganismos, podendo ser adequado para a produção biotecnológica de certo número de produtos químicos em processos fermentativos. Assim sua bioconversão gera não somente CB mais também diversos metabólitos (NABE et al., 1979; ZHU et al., 2008; ZHANG et. al., 2010).

A demanda por determinado substrato depende muito da cepa de *G. xylinus* utilizada. No caso da *G. xylinus* BPR2001 o rendimento mais elevado de celulose é em um meio contendo frutose, enquanto que *G. xylinus* A9 tem seu maior rendimento em meio contendo glucose e extrato de levedura. *G. xylinus* K3 tem preferência por manitol (MATSUOKA et al., 1996; SON et al., 2001; NGUYEN et al., 2008).

3.3 Biossíntese de Celulose

A biossíntese de celulose em bactérias é um processo que ocorre através de etapas que envolve várias enzimas e um operon denominado bcs (bacterial cellulose synthesis). Este operon codifica proteínas e enzimas que compõem uma associação para a polimerização da glucose e a formação de celulose (RECOUVREUX et al., 2005).

A via de conversão da glucose em celulose envolve várias reações. A utilização de determinado substrato para a produção de CB por *G. xylinus* pode ocorrer através de duas vias: a via das pentoses-fosfato para a oxidação de hidratos de carbono e o ciclo de Krebs para a oxidação de ácidos orgânicos e compostos relacionados (Figura 2) (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Os diferentes compostos utilizados como fonte de carbono seguem vias distintas durante o seu metabolismo. A produção do polissacarídeo a partir de glucose se inicia com o transporte da glucose e a fosforilação da glucose no carbono 6 pela enzima glucoquinase (CE 2.7.1.2). Em seguida a fosfoglucomutase catalisa a isomerização da glucose-6-fosfato a glucose-1-fosfato que é convertida em UDP-glucose (uridina difosfato glucose) na presença de UTP (uridina trifosfato) e da enzima UDPG fosforilase (CE 5.4.2.2). A UDP-glucose produzida é utilizada como substrato pela enzima celulose sintase (*CesA*) e é ativada pelo nucleotídeo cíclico diguanilmonofosfato, c-di-GMP (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

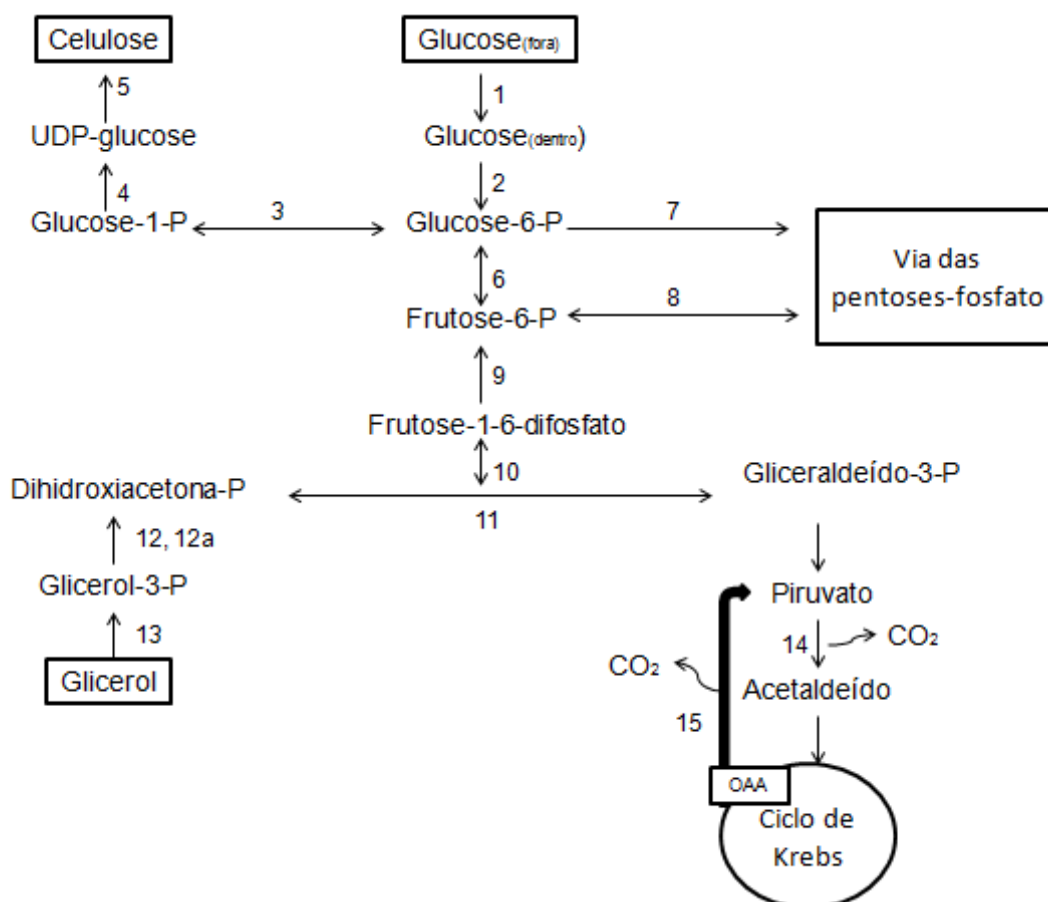
A *G. xylinus* é incapaz de metabolizar a glicose anaerobicamente devido à carência da fosfofrutoquinase-1, enzima responsável pela catálise da reação de fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato, o que inviabiliza a glicólise (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Quando o glicerol é a fonte de carbono, este pode fazer parte de duas vias que tem sido relatada para a formação da diidroxiacetona-fosfato. O passo inicial para a utilização de glicerol é a sua absorção na célula. Por ser pequena e sem carga, a molécula pode difundir através das membranas, sem um sistema de transporte, porém muitos organismos possuem transportadores de glicerol (HELLER, 1980).

A via bioquímica para a produção de celulose pela bactéria *G. xylinus* utiliza a via de glicerol-3-fosfato. Nesta via o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol desidroxiacetonaquinase, dependente de ATP. Em seguida a glicerol-3-fosfato desidrogenase, dependente de NAD ou FAD (EC 1.1.1.8), fosforila o glicerol-3-fosfato que é oxidado para se obter diidroxiacetona-fosfato. Este composto origina frutose-1,6-difosfato, que é convertida em frutose-6-fosfato. Os três passos finais de biossíntese de celulose são idênticos para todas as fontes de carbono consideradas, que após serem convertidos em frutose-6-fosfato (intermediário comum à gluconeogênese e à via das pentoses-fosfato), seguem a via

de síntese de celulose, já referida no parágrafo anterior (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Figura 2 - Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por *G. xylinus* a partir das fontes de carbono glucose e glicerol.

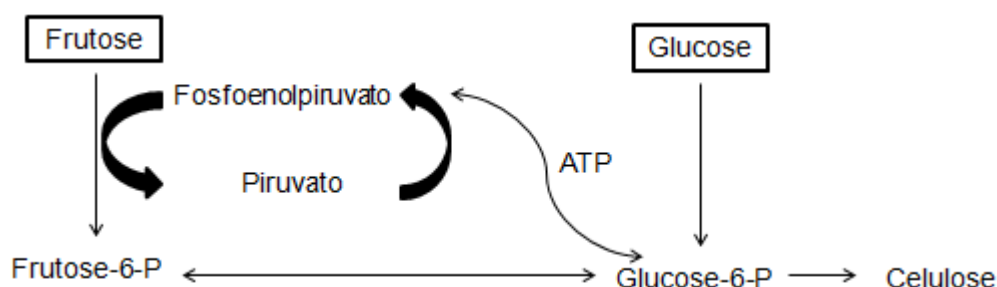


1-glucose permease (EC 2.7.1.69); 2- glucocinase (ATP) (EC 2.7.1.2); 3- fosfoglucomutase (EC 5.3.1.9); 4- UDPGlc pirofosforilase (UTP) (EC 2.7.7.9); 5- celulose sintetase (EC 2.4.1.12); 6- fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9); 7- glucose-6-fosfato desidrogenase (NADP) (EC 1.1.1.49); 8- transaldolase (EC 2.2.1.2); 9 – frutose difosfatase (EC 3.1.3.11); 10- aldolase (EC 4.1.2.13); 11- triose fosfato isomerase (5.3.1.1); 12- glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD) (EC 1.1.1.8); 12a- glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8) (FAD); 13- glicerol desidroxiacetonaquinase (ATP) (2.7.1.30); 14- piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1); 15-oxaloacetato desidrogenase (EC 4.1.1.3); P- fosfato; OAA- oxaloacetato (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

No caso da biossíntese a partir de sacarose, esta é primeiramente hidrolisada no periplasma a glucose e frutose, sendo que a o processo de conversão da glucose

ocorre como já mencionado e a frutose é transportada e fosforilada a frutose-6-fosfato pelas fosfotransferases que utilizam fosfoenolpiruvato como doador de fosfato, concomitantemente produzem piruvato, que pode ser reconstituído a fosfoenolpiruvato com a utilização de ATP. Além disso, uma isomerase fosfohexose interconverte livremente G6P e F6P (Figura 3) (VELASCO-BEDRAN; LOPEZ-ISUNZA, 2007).

Figura 3 – Início da via bioquímica para a produção de celulose bacteriana por *G. xylinus* a partir da hidrólise da sacarose em frutose e glucose.



Fonte: VELASCO-BEDRAN; LOPEZ-ISUNZA, 2007.

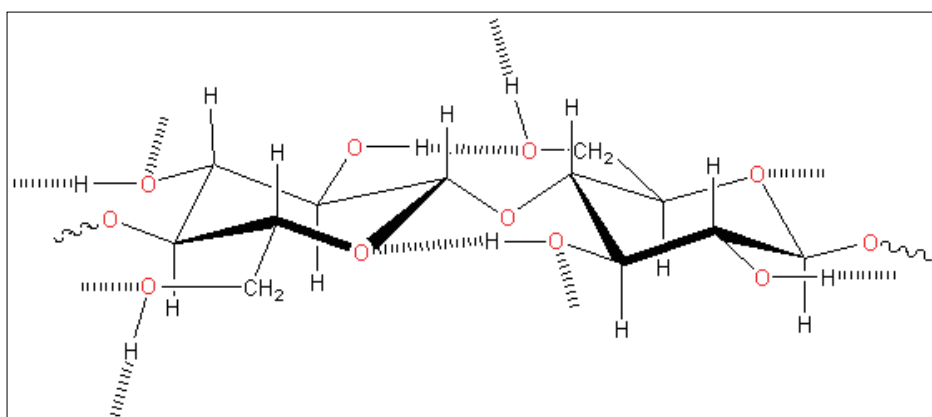
3.4 Produtos da Fermentação

3.4.1 *Celulose Bacteriana*

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por duas moléculas de D-glucose, a celobiose, unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Essas ligações garantem um alinhamento linear da molécula, permitindo a formação de duas ligações de hidrogênio intramoleculares dentro de cada resíduo de glucose e ainda ligações intermoleculares de hidrogênio entre as diferentes cadeias de celulose. A polimerização da cadeia glucana varia de 2.000 a 6.000 resíduos de glucose em CB, enquanto que em celulose vegetal os valores são de 13.000 a 14.000 resíduos. As pontes de hidrogênio intra e intermoleculares formadas pelos grupos hidroxílicos são responsáveis pela rigidez da cadeia, formação de nanofibras e fazem com que a

celulose seja insolúvel em água e em alguns solventes orgânicos (Figura 4) (NABE et. al, 1979; DELMER; AMOR, 1995; JONAS; FARAH, 1998).

Figura 4 - Estrutura linear da celulose com ligações de ponte de hidrogênio.



A estrutura molecular da celulose confere propriedades tais como hidrofiliabilidade, quiralidade, degradabilidade e ampla variabilidade química iniciada pela alta reatividade dos grupos hidroxilas (OH). Estas características são a base para as extensas redes de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas, dando a celulose uma miríade de morfologias estruturais de fibra parcialmente cristalinas (KLEMM et al., 2005).

Diversos graus de cristalinidade da celulose são conhecidos, esses são dependentes da fonte e do tratamento que recebem, conhecidos como celulose I, II, III e IV. As formas cristalinas mais comuns de celulose são celulose I e celulose II que podem ser diferenciadas através de difração de raios-X, análise de infravermelho e RMN C13 CP-MAS. A única encontrada na natureza é a celulose I, é composta por duas distintas fases cristalinas conhecidas como $I\alpha$ e $I\beta$ que se diferenciam pelas pontes de hidrogênio e na conformação das cadeias vizinha. A celulose do tipo I é menos estável, formada por cadeias de glicose $\beta(1-4)$ com arranjo paralelo, sintetizadas pela maioria das plantas e também pela bactéria *Acetobacter xylinum* em cultura estática. A celulose do tipo II é a forma cristalina que surge da recristalização com NaOH aquoso e é termodinamicamente a forma cristalina mais estável, devido às ligações de hidrogênio. Comparando as formas

mais comuns de fermentação, a celulose produzida por *G.xylinus* em cultura estática apresentaram um índice de cristalinidade de 80 % enquanto que a agitada foi de 76 % (BEN-BASSAT et al., 1992; KONTTURI; TAMMLEN; ÖSTERBERTG, 2006; NGUYEN et al., 2008).

A celulose é o mais abundante biopolímero encontrado na natureza, sendo o principal componente da parede celular das plantas. É bastante utilizada como matéria-prima para produção de fibras têxtil e fabricação de papel, sendo ainda que seu tratamento químico gera importantes derivados como ésteres, acetatos e nitratos, que estão envolvidos em diversos processos industriais (CHÁVES-PACHECO et al., 2005; YANG et al., 2007).

Quase que a totalidade da produção mundial de celulose para usos comerciais é feita pela obtenção através das plantas. Para a obtenção desta celulose vegetal é necessário a sua separação de outros compostos como hemicelulose e lignina, através de reações extremamente poluentes que ao serem realizadas produzem compostos como os organoclorados, entre outros, igualmente nocivos ao meio ambiente. Em contraste a celulose bacteriana não necessita de processos químicos severos de purificação, para a remoção de lignina e outras substâncias, pois estas não se encontram presentes na CB, minimizando a agressão ao meio ambiente e reduzindo os custos para a indústria tornando mais favorável o seu benefício que o da celulose da madeira (YOSHINAGA; TONOSCHI; WATANABE, 1997).

Os microrganismos são capazes de produzir celulose como metabólito primário extracelular sendo obtida através de rotas de biossíntese por meio de bactérias de alguns gêneros como: *Gluconacetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Salmonella* (HESTRIN; SCHEAMM, 1954; KLEMM et al., 2005).

Os produtores mais eficientes são bactérias produtoras de ácido acético como *Gluconacetobacter xylinus*. A fermentação para produção da CB é normalmente realizada em condições estáticas com temperaturas em torno de 28 a 30 °C. O meio se torna turvo e, depois de um período, uma película aparece na superfície. A espessura da película aumenta com o tempo, podendo atingir 25 mm após 4 semanas (LIN et al., 1985; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; LEE et al., 2001; DONINI et al, 2010).

A formação da CB se inicia com o aumento da população de bactérias e com a captação do oxigênio dissolvido no meio, produzindo celulose na fase líquida causando assim a turbidez do meio de cultivo. Com a diminuição do oxigênio dissolvido, somente as bactérias próximas à superfície continuam produzindo celulose, sendo que após uma semana ou 10 dias de incubação a espessura, a massa e a produção de celulose tendem a diminuir (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

Quanto a formação das fibras de celulose as cadeias de CB agregam-se formando sub-fibrilas com uma largura de aproximadamente 1.5 nm. Estas sub-fibrilas agrupam-se com outras 36 sub-fibrilas semelhantes, originando uma fibrila elementar, com um diâmetro de aproximadamente 3.5 nm. Cerca de 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de pontes de hidrogênio formando um *ribbon*, que é o nome dado às fibras. A CB é produzida na forma de membrana gelatinosa, composta por 99 % de água, e quando seca se assemelha a uma folha de papel translúcido com discreto brilho superficial (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997; GELIN et al., 2007; PECORARO et al., 2008)

Suas aplicações são bastante diversificadas sendo que primeiramente foi usada como matéria-prima para produção da nata de coco, uma película gelatinosa cortada em cubos e imersa em xarope de açúcar utilizada como sobremesa indígena na Filipina (BUDHIONO et al., 1999).

A partir da década de 1990, a CB teve aplicação intensa nos segmentos da indústria alimentícia, têxtil, papel, odontológica e farmacêutica. Sua aplicação na indústria farmacêutica é destacada devido aos amplos estudos de sua utilização na regeneração tecidual guiada (RTG) in vivo, por ser biocompatível, inerte, atóxica, ter estrutura e resistência adequadas, ser seletivamente permeável e ser absorvida pelo organismo (JONAS; FARAH, 1998; YAMANAKA et al., 1998; NAKAGAITO; IWAMOTO; YANO, 2005; KLEMM et al. 2006;).

Nos últimos anos tem atraído interesse na produção de material de embalagem, por ser biodegradável e por poder carrear uma ampla gama de agentes antimicrobianos (NGYEN; GIDLEY; DYKES, 2008).

3.4.2 *Metabólitos*

Além da produção de celulose pela associação das fontes sacarose e glicose com glicerol, existe ainda o interesse nos subprodutos formados pela conversão microbiana de glicerol, através de leveduras, fungos, microalgas e diversas bactérias (LI; LESNIK; LIU, 2013).

Estudos da fermentação de glicerol por bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae demonstraram a formação do subproduto propanodiol, segundo Ten Dan e Hanefeld (2011) o produto comercial mais interessante obtido a partir do glicerol é o 1,3-propanodiol, ou 1,3-propileno glicol, que pode ser usado em várias aplicações químicas, como formulação de poliésteres, poliéteres, poliuretanos, adesivos, compostos laminados, revestimentos e molduras.

O ácido glicérico é conhecido também como subproduto da produção do glicerol, essa conversão pode ser realizada por bactérias do ácido acético como *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter tropicalis* e *Gluconacetobacter sp.* como já descrito. A aplicação mais conhecida do ácido glicérico é na área química (HABE et al., 2009).

A diidroxiacetona (DHA) é um cetotriose que é preparada através da fermentação microbiana de glicerol por espécies da família Acetobacter. A DHA existe naturalmente como um monômero em plantas, mas é normalmente adquirida na forma de dímero, como um pó branco cristalino. As espécies *G. oxydans* e *G. xylinus* estão equipadas com uma membrana ligada ao glicerol desidrogenase que é responsável pela oxidação do glicerol em DHA. As bactérias capazes de converter glicerol possuem a enzima glicerol desidrogenase (GlyDH) e a sua capacidade de quantificar DHA é dependente da quantidade de ubiquinona -10 (YAMADA et al., 1982; STASIAK-RÓŻAŃSKA; BŁAŻEJAK; MIKLASZEWSKA., 2011; LU et al., 2012).

Como parte do metabolismo dos microrganismos encontram-se os aminoácidos, possuindo um alto valor comercial, sendo que estes podem ser aplicados como potenciadores de sabor (L-glutamato), aditivos para a alimentação animal (L-lisina, L-metionina, L-treonina, L-triptofano), produção de edulcorantes, tais como aspartame (L-aspartato, L-fenilalanina), e várias aplicações farmacêuticas.

A síntese de aminoácidos ocorre a partir de intermediários da glicólise, via das pentoses fosfato e ciclo do ácido cítrico, estando relacionada com a origem do

esqueleto carbônico dos aminoácidos. No início da glicólise a glicose é convertida em glucose-6-fosfato que gera ribose-5-fosfato, que é precursora do aminoácido histidina, e 3-fosfoglicerato, que sintetiza serina e esta cisteína e glicina. Glucose-6-fosfato sofre diversas reações até a formação de fosfoenolpiruvato que juntamente com eritrose-4-fosfato geram fenilamina e triptofano que são precursores da tirosina. A partir do fosfoenolpiruvato é originado o piruvato que é precursor da síntese de alanina, valina e leucina. No ciclo do ácido cítrico o α -cetoglutarato gera glutamato que origina arginina, glutamina e prolina. No mesmo ciclo o oxaloacetato é precursor de diversos aminoácidos como aspartato, asparagine, lisina, treonina, cisteína e isoleucina. (LEHNINGER, 2002).

Na via de utilização de glicerol como fonte de carbono pelas bactérias *Enterobacteriaceae sp.*, o piruvato formado na glicólise é precursor da produção do lactato, que na presença de lactato desidrogenase, se torna precursor de 1,2-propileno glicol (LI; LESNIK; LIU, 2013).

3.5 Caracterização Química e Física das Membranas

A caracterização física da CB e do meio líquido pode ser realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) em estado sólido e líquido. É uma técnica de espectroscopia nuclear utilizada em vários ramos da ciência, no qual os núcleos - ao absorverem e emitirem radiofrequência - revelam seus espectros característicos. Seu objetivo é obter informações específicas sobre a dinâmica e a estrutura de moléculas, dos estados atômicos na molécula e da amostra em estudo, a partir da interação dos momentos magnéticos (ou spins) nucleares com a sua vizinhança. A aplicação da RMN na caracterização de lignoceluloses em estados sólidos e líquidos cresceu nas décadas passadas. Isto, devido aos átomos de carbono dos grupos funcionais que contêm o oxigênio (como a carbonila e o aldeído) e substitutos aromáticos do anel podem ser observados. Entretanto, os inconvenientes do RMN para estados sólidos são a sensibilidade mais baixa e a falta de proporcionalidade entre a intensidade dos sinais e concentração, sendo fundamental a dissolução da celulose ou outros materiais sólidos (PANTZE, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 *Glicerol, sacarose e glucose*

Foram utilizadas como fonte de carbono dos meios de cultivo, glucose, sacarose e glicerol para análise.

4.1.2 *Cepa bacteriana*

Utilizou-se *Gluconacetobacte xylinus* ATCC 23769 lote T12/8/A obtido na Fundação André Torsello de Campinas, São Paulo.

4.1.3 *Meios de cultura*

O meio utilizado para produção da celulose bacteriana foi o meio HESTRIN-SCHRAMM (1954) modificado, que tem sua composição baseada nas principais fontes para o crescimento do microrganismo: fontes de carbono (sacarose ou glucose %) fonte de nitrogênio (extrato de levedura 0,5 %), fonte de aminoácido (peptona bacteriológica 0,5 %), sais (Na_2HPO_4 0,27 %) e ácido cítrico 1,15 %. Os meios foram esterilizados por 20 minutos em autoclave, a 121° C, com 1,1 kgf/cm².

As fontes de carbono utilizadas tiveram suas concentrações testas do seguinte modo: glicerol 2 % / glucose 4 %, glicerol 1 % / glucose 2 % e glucose 8 % / glicerol 2 % / sacarose 8 % (m/V).

4.2 Métodos Biológicos

4.2.1 *Manutenção do microrganismo*

Várias metodologias permitem a manutenção de culturas viáveis no laboratório durante períodos de tempo mais ou menos longos, a utilizada para preservar a cepa *G. xylinus*, diminuindo o risco de alteração no perfil genético, foi o congelamento da linhagem. Foi preparada uma suspensão da cultura pura liofilizada

do microrganismo *G. xylinus* em meio HS com glucose a 4 %, esta suspensão foi deixada por 7 dias em agitador de bancada a 28 °C sob agitação de 100 rpm. A partir desta suspensão um pré-inóculo de 200 mL foi realizado em meio HS com glucose a 4 % permanecendo sob as mesmas condições de temperatura e agitação por 48 h, após esse período alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio e colocadas em eppendorfs estéreis que foram centrifugados por 1 minuto a 13000 g em microcentrífuga refrigerada. Esse processo foi repetido 2 vezes para cada eppendorf, entre as centrifugações o material foi ressuscitado, após as centrifugações o sobrenadante foi desprezado e 1mL de glicerol 10 % estéril foi adicionado ao precipitado de cada frasco que foi identificado e armazenado em freezer - 85° C. Todo procedimento foi realizado de forma asséptica.

4.2.2 ***Produção de celulose bacteriana***

A celulose bacteriana foi obtida em fermentação estática. Na fermentação estática controlou-se a temperatura em 28 °C em estufa bacteriológica. Para cada meio de cultivo de 500 mL foi adicionado 4 eppendorfs de bactéria padronizadas. Todas as fermentações duraram 10 dias, e nos dia 4, 7 e 10 as membranas eram retiradas das placas e separadas do meio de cultura onde foram analisados o pH do meio, tratamento da celulose, secagem das membranas, rendimento na produção de celulose e análise do meio de cultura e da celulose por RMN.

A concentração das fontes de carbono foi organizada para gerar um espectro de resposta à concentração do glicerol no meio. Todos os meios contem glicerol na sua composição em proporções de 2:1 e 1:2 a glucose e sacarose em 1:4. As proporções levaram em conta a molaridade de cada fonte de carbono e a massa, sendo que a composição das massas dos meios utilizados na produção de celulose está indicada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de massa dos meios para produção de celulose bacteriana variando concentração e presença de glicerol, sacarose e glucose.

Composição	massa g/100 g água		
	glucose	sacarose	Glycerol
glu8	8	-	-
gly2+glu4	4	-	2
gly2+sac8	-	7,6	2
gly1+glu2	2	-	1

4.3 Métodos químicos

4.3.1 *Tratamento da celulose*

A celulose obtida a partir dos meios foi retirada na forma de filme nas culturas estáticas nos dias 4, 7 e 10 de fermentação e em seguida foi realizado o processo de lavagem das membranas. Após a retirada das membranas das placas de petri, estas foram transferidas para um béquer com 200 mL de água onde ficam sob agitação, por bastão de vidro, pelo período de 10 minutos, o processo foi repetido por 3 vezes.

Em seguida o processo foi realizado novamente, porém com solução de NaOH 2 %. As membranas então foram armazenadas em solução de NaOH 1% por um período de 48 horas.

Posteriormente as membranas foram retiradas da solução e colocadas em e um béquer com 500 mL de água destilada até sua neutralização.

4.4 Métodos Físicos

4.4.1 *Massa da celulose bacteriana*

A massa de celulose foi determinada através de secagem e pesagem da película. As membranas presentes em solução de água destilada em pH 7,0, foram retiradas e colocadas em placas de petri envoltas por tecido e distribuídas em estufa a temperatura de 80 °C por um período de 15-30 minutos, dependendo da

espessura da membrana. Após a secagem, as membranas foram pesadas em balança analítica e armazenadas para análises em RMN de estado sólido.

4.4.2 ***Processamento meio de cultura***

Após a retirada das películas de membrana, os meios de cultura foram centrifugados durante 15 minutos, a 5000 rpm, onde o pellet era descartado e o sobrenadante armazenado para futuras análises em RMN de estado líquido.

4.4.3 ***Cálculo do rendimento da membrana***

O rendimento da celulose foi calculado conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Rendimento} = m_{CB} \cdot 100 / Si$$

Onde m_{CB} é a massa seca da celulose e Si a quantidade de açúcar inicial presente em cada placa.

4.4.4 ***Ressonância magnética nuclear (RMN)***

As amostras derivadas de celulosas bacteriana foram solubilizadas em cerca de 0,5 mL acetona- d_6 ou DMSO- d_6 e analisadas no aparelho de Ressonância Magnética Nuclear DRX 400, Bruker, em 400 MHz para hidrogênio (1H -RMN) e 100 MHz para carbono (^{13}C -RMN), a 25 °C ou 70 °C. Os metabólitos também serão observados por sinais de RMN.

4.4.5 ***Cálculo do índice de cristalinidade por Ressonância magnética nuclear (RMN)***

Para calcular o índice de cristalinidade (IC), foi realizada a razão entre os picos integrados $I_c / (I_a + I_c) \cdot 100$ para regiões cristalinas / regiões amorfas, por ajuste de pico utilizando o Bruker TopSpin 3.1 software ou o software Origin 8.1.

4.4.6 ***Busca e quantificação de metabólitos por Ressonância Magnética nuclear (RMN)***

A busca foi realizada no banco de dados do Chenomx NMR Suite e a confirmação da presença destes metabólitos, nos espectros transformados no ACDLabs 11.0 tanto para espectros 1D como 2D. Os deslocamentos químicos foram confirmados por espectros padrão nos bancos de dados HMDB.

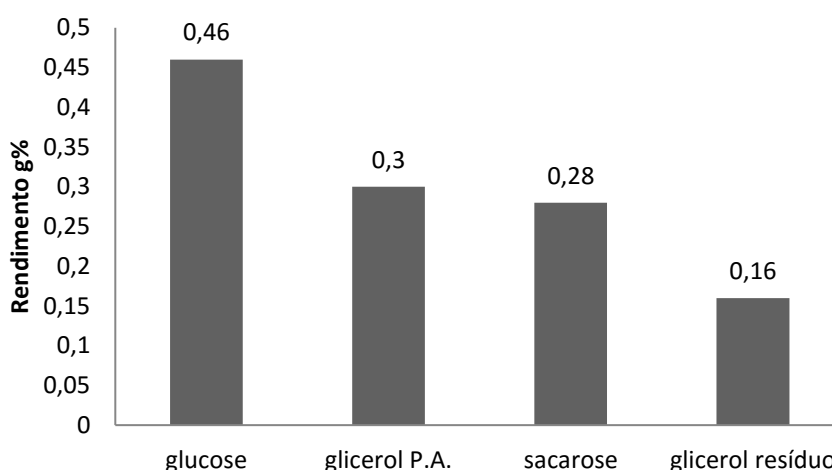
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Testes Preliminares

Para obtenção de celulose bacteriana por *G. xylinus* foram realizados cultivos preliminares com fontes de carbono únicas de sacarose, glucose, glicerol industrial e glicerol resíduo de biodiesel, em concentração de 1%.

Nos meios contendo glucose como única fonte, notou-se a presença de CB a partir do quarto dia, onde a membrana ocupava toda a área da placa de petri, porém se apresentava fina. O aumento da espessura da CB foi ocorrendo conforme o passar dos dias, sendo que no décimo dia de cultivo a CB se apresentava bastante espessa, com rendimento final de 0,46 g% (Figura 5). Estudos com glucose como única fonte de carbono são os mais comuns, e como já esperado esta como fonte única de carbono produz CB em diferentes concentrações e diferentes períodos de fermentação (MIKKELSEN et.al., 2009; VAZQUEZ et. al., 2013).

Figura 5 – Rendimentos das fontes glucose, glicerol para análise (P.A), sacarose e glicerol resíduo no 10º dia de fermentação.



A segunda fonte mais produtiva foi glicerol p.a com rendimento final de 0,30 g%. No quarto e no sétimo dia a membrana se apresentava extremamente fina, porém quando coletada no décimo dia estava espessa e ocupava toda a área da

placa de petri. Quando empregada sacarose como única fonte de carbono, a presença da CB começou a ser perceptível a partir do quarto dia, porém se encontrava pequena e fina. Já no sétimo e décimo dia a CB era espessa e ocupava toda a área da placa, com rendimento final de 0,28 g% (Figura 5).

No presente estudo, o glicerol resíduo do biodiesel como fonte de carbono foi à fonte com menor rendimento obtido, 0,16 g%, a membrana coletada no décimo dia se apresentava espessa e ocupando toda a área da placa (Figura 5). Estudo com glicerol resíduo foi realizado por Carreira (2010) que analisou a produção de CB por *G. xylinus* a partir de resíduos ou subprodutos baratos da indústria, entre eles da indústria da pasta e papel, vinho, laticínios e do biodiesel. Após as 96 h de fermentação todos os meios obtiveram celulose como subproduto, sendo que o glicerol foi o terceiro resíduo com maior rendimento.

Estudo semelhante foi realizado por Mikkelsen e colaboradores (2009) onde investigaram o efeito de seis diferentes fontes de carbono, glucose, glicerol, manitol, frutose, sacarose e galactose, respectivamente, sobre a produção de CB por *G. xylinus* ATCC 53524. Os rendimentos de CB obtidos utilizando diferentes fontes de carbono foram determinados em intervalos de tempo de 12 h e o período do experimento foi de 96 h. No final do período, a fonte mais produtiva de carbono para CB foi a sacarose com rendimento de 3,83 g.L⁻¹, seguido por glicerol, manitol, glucose, frutose, respectivamente.

Os testes pré-eliminares, constataram que todas as fontes testadas produzem CB, algumas no quarto dia e outras a partir do sétimo, porém no décimo dia todas se apresentaram espessas. Assim novos testes foram realizados a fim de buscar a associação entre as fontes de carbono. O glicerol foi a peça chave dos meios sendo que esteve presente em todas as formulações. O interesse em associar o glicerol com outras fontes foi de obter com esta cepa melhores rendimentos e conhecer o metabolismo envolvido neste processo a fim de oferecer alternativas para otimizar a obtenção das membranas de CB com as mesmas características usuais.

5.2 Variação do pH

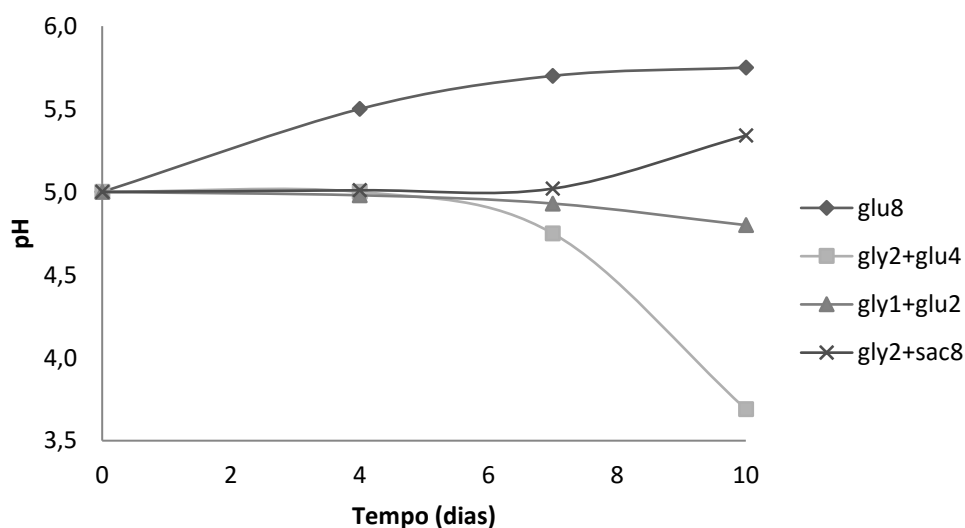
Durante o processo fermentativo, ao mesmo tempo em que foram retiradas as membranas o pH do meio foi verificado, de forma a avaliar a sua variação. Foi

estabelecido que o pH inicial dos meios fosse 5,0, determinado com base em referências (MIKKELSEN et al., 2009).

De acordo com a Figura 6, entre os meios que possuíam glucose em sua composição, o meio glu8 apresentou um aumento de pH crescente durante os dias de fermentação, sendo que no 10º dia o pH se encontrava em 5,8. O aumento do pH em meio contendo somente glucose, foi observado também por Mikkelsen e colaboradores (2009), quando produziu celulose pela bactéria *G. xylinus* em condições estáticas por um período de 96 horas obtendo pH final de 5,33.

Em contrapartida os meios contendo glicerol associados à glucose apresentaram queda no pH. No meio gly2+glu4 foi observado queda no pH a partir do 7º dia com 4,8 e no 10º dia atingindo o valor de 3,7. O meio glu1+glu2 praticamente não apresentou variação no pH, bem como no meio contendo sacarose, gly2+sac8 onde o pH final foi de 5,34 (Figura 6).

Figura 6 - Variação do pH em função do tempo de fermentação dos processos fermentativos estáticos com *G. xylinus*.



A tendência da acidificação do pH durante o processo fermentativo, é devido a formação de ácidos orgânicos produzidos a partir da fermentação da glucose. Segundo Hwang e colaboradores (1999), no caso da *G. xylinus* o ácido glucônico e

cetoglucônicos, são os responsáveis pela queda do pH durante a fermentação, reduzindo o rendimento das fermentações. Já o meio contendo sacarose não produz ácido glucônico mantendo assim o pH estável.

Correlacionando com os rendimentos de membrana, é possível concluir que a queda nos valores de pH influencia diretamente no rendimento de CB, induzindo a rendimentos menores.

5.3 Formação de Membrana e Rendimento

Quanto a formação de membrana e rendimento, as fermentações estáticas demonstraram que no quarto dia nenhum dos meios havia membrana, esta começou a ser produzida a partir do sétimo dia. O rendimento foi obtido através da relação da massa total de carbono adicionada com a massa de membrana obtida para cada dia, como exposto na Tabela 2.

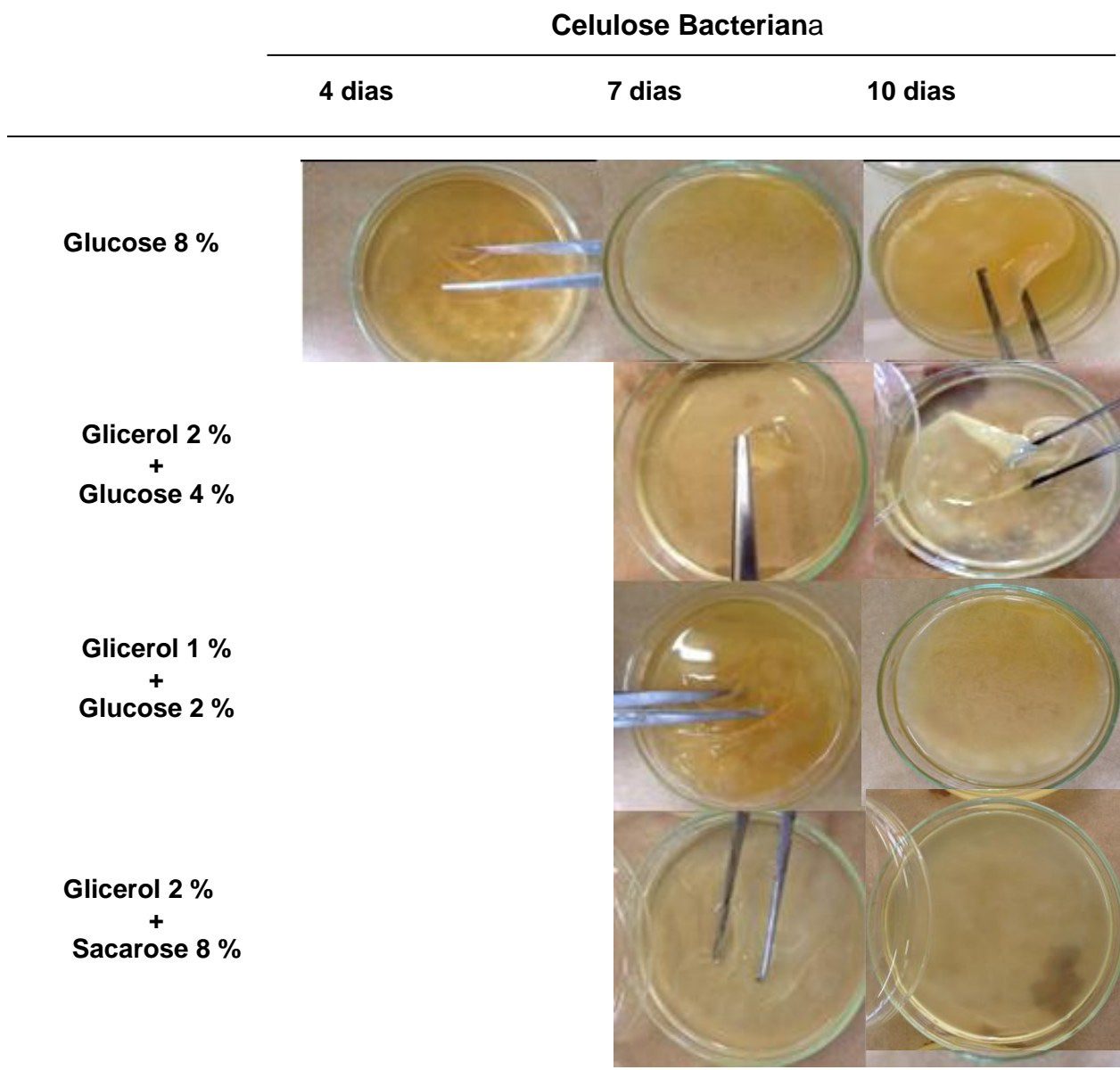
Tabela 2 - Relação massa total de carbono adicionada nos meios com a massa de membrana obtida para cada meio em função do tempo (dias).

composição	rendimento g%		
	4	7	10
glu8	1,9	2,6	3
gly2+glu4	0	0,4	1,7
gly2+sac8	0	0,7	1,1
gly1+glu2	0	1,6	3,5

O meio glu8 foi o único que apresentou membrana com 4 dias, com rendimento de 1,9 g% e no sétimo dia 2,6 g%, atingindo maior rendimentos no décimo dia de fermentação com 3 g% (Tabela 2). Isto pode ser observado onde os filmes de celulose, livres de contaminação, estão ocupando toda a superfície da placa de petri (Figura 7). As membranas obtidas com o meio glu8 tem aspecto espesso, entumecido e apesar de volumoso apresenta pouca massa de celulose, correspondendo principalmente a água, uma vez que esta pode estar absorvendo

cerca de 100 x sua massa em água após produzida. A água é retida durante o processo de biossíntese sendo aprisionada pelas fibras que se desenvolvem a volta (PARK et al., 2006; SEIFERT et al., 2004).

Figura 7 - Filmes de celulose bacteriana formados após 4, 7 e 10 dias.



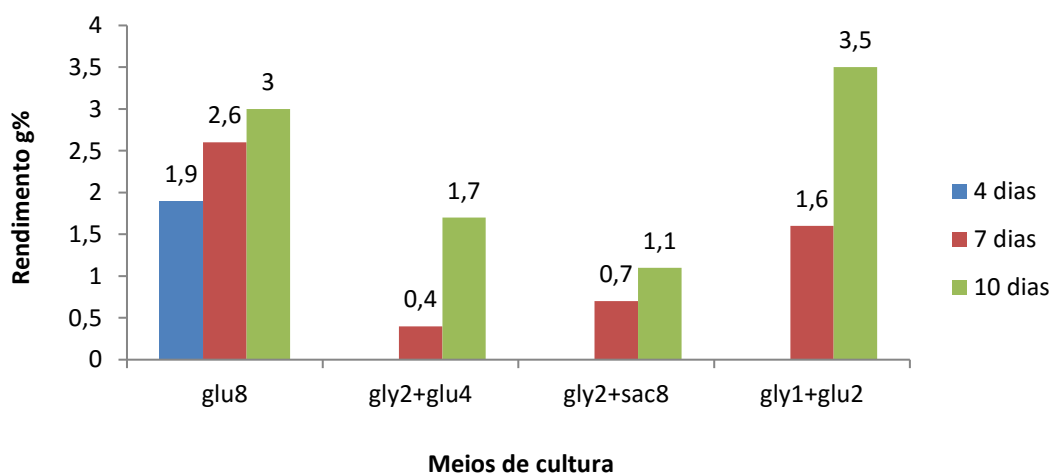
Considerando a associação das diferentes fontes o meio gly2+glu4 formou membrana perceptível com 7 dias (Figura 7); as membranas formadas com 10 dias

apresentam massa de 0,05 g de peso seco médio, com rendimento de 1,7 g% em relação a massa de glucose e glicerol adicionados (Tabela 2)

As placas fermentadas no meio gly1+glu2 apresentaram membranas também no dia 7 e 10 (Figura 7), com 0,02 g e 0,05 g de peso seco, o que significou em termos de aproveitamento do carbono adicionado uma conversão de 1,6 g% e 3,5 g% respectivamente (Tabela 2). Considerando apenas este último parâmetro este se mostrou um rendimento bastante razoável.

No meio contendo sacarose, gly2+sac8, obteve-se a presença de uma membrana fina na placa dia 7 e com uma massa de 0,03 g e rendimento de 0,7 g%, no dia 10 a massa e o rendimento era respectivamente de 0,04 e 1,1 g%, sendo que a membrana mesmo que fina, ocupava toda área da placa de petri.

Figura 8 – Relação massa total de carbono adicionada nos meios com a massa de membrana obtida para cada meio.



Conforme a Figura 8, foi possível observar que em glu8 houve um aumento crescente de CB, mas que nos outros meios foi necessário um período mais longo para obtenção de membrana, sendo que o meio gly1+glu2 foi que apresentou o maior rendimento dentre todas as fontes testadas.

5.4 Análise por ressonância magnética nuclear no estado sólido (CP MAS ^{13}C rmn) das membranas de celulose bacteriana

As amostras de celulose foram submetidas à análise para comparação da cristalinidade dos materiais obtidos nos diferentes meios.

Os meios contendo glucose apresentaram índices de cristalinidade entre 67,6 IC% a 73 IC%, sendo o maior valor obtido no dia 7. O meio contendo sacarose apresentou índice de 79,4 IC% no dia 7 e 70,4 IC% no dia 10. Apenas o meio gly1+glu2 não apresentou índice acima de 70 % em momento algum (Tabela 3).

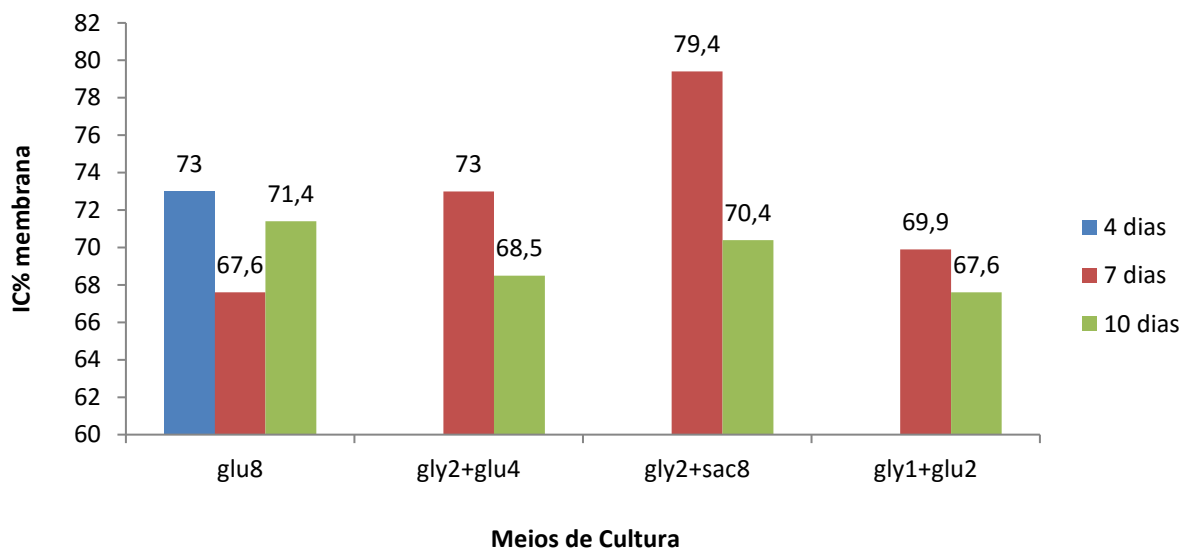
Os valores do índice de cristalinidade da celulose bacteriana encontrados na literatura com glucose como fonte de carbono variam entre 71 IC% a 79 IC%. Em meios contendo sacarose os índices de cristalinidade encontrados foram de 69 IC % a 81,2 IC % (WATANABE et.al., 1998; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; MOHITE; PATIL, 2014).

Os valores, na sua maioria, foram próximos aos observados em trabalhos anteriores, entre 67 a 79 %, contudo uma análise de cristalinidade indicou uma clara tendência para uma maior cristalinidade nas membranas obtidas com 7 dias de fermentação nos meios que possuíam glicerol associado, como gly2+glu4 com 73 IC%, gly2+saco com 79,4 IC% e 69,9 IC% em gly1+glu2 (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de cristalinidade das membranas nos meios de cultivo com glicerol.

composição	IC% membrana		
	4	7	10
glu8	73	67,6	71,4
gly2+glu4		73	68,5
gly2+sac8		79,4	70,4
gly1+glu2		69,9	67,6

Figura 9 - Relação entre o índice de cristalinidade das membranas obtidas nos diferentes meios de cultura.



Relacionando a cristalinidade da Tabela 3 com o rendimento, pode-se considerar que estas características são inversamente proporcionais, pois no dia 7 de fermentação onde os índices de cristalinidade foram maiores, os rendimentos de membranas foram baixos (Figura 8).

Além das regiões cristalinas a celulose é composta por regiões amorfas, que dependendo do tratamento e da fonte da celulose, o seu grau de cristalinidade varia, sendo que sua composição determina o tipo de celulose que forma a membrana. A literatura relata dois tipos de celulose produzidos naturalmente pela *G. xylinus*, a Cel I em condições normais, e a Cel II quando submetida a estresse térmico ou mecânico (GOELZER et al., 2009).

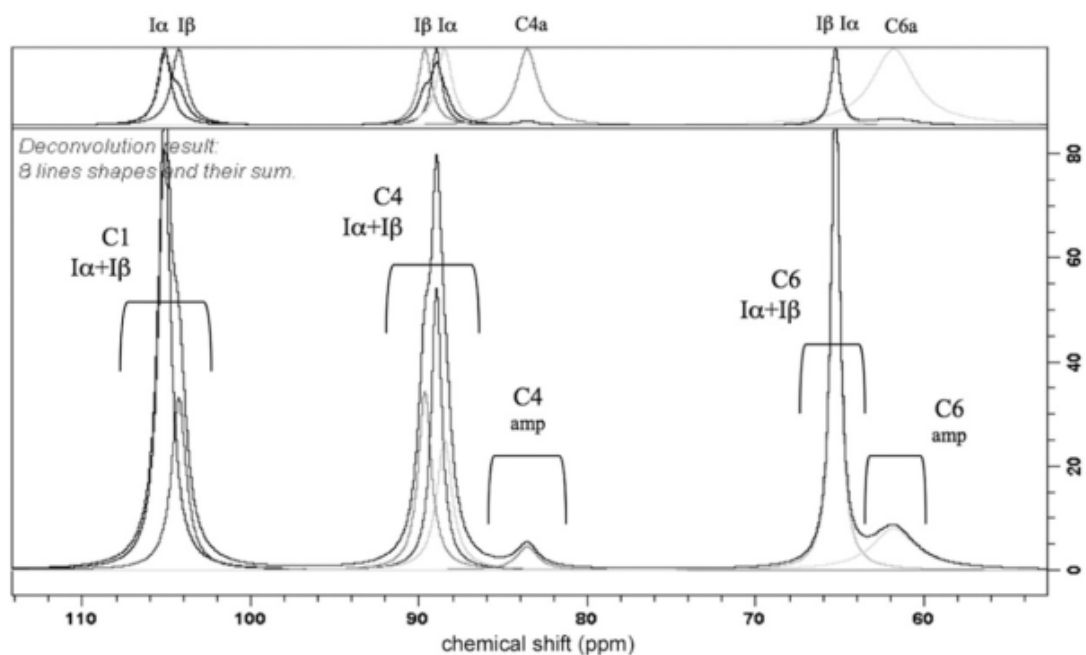
As análises dos espectros de RMN sólido foram bastante similares entre si, apresentando sinais característicos para celulosas majoritariamente cristalinas do tipo Cel I. Os sinais químicos obtidos exibem uma mistura de Cel I α e I β assim como os obtidos por Faria-Tischer (2015) (Figura 10), sendo que observa-se sinal anomérico (C1) na região de 103 ppm, os sinais para C4 cristalino e amorfo (82 a 92 ppm) e o de C6 entre 60 a 65 ppm (Figura 11).

A celulose I é composta por duas distintas fases cristalinas conhecidas como I α e I β que se diferenciam por diferentes padrões de difração, a celulose I (alfa)

triclínica e a celulose I (beta) monoclínica. A diferença entre elas ocorre nas pontes de hidrogênio e na conformação das cadeias de celulose (FINK et al., 1997; KOYAMA et al., 1997; KLEMM et al., 2006).

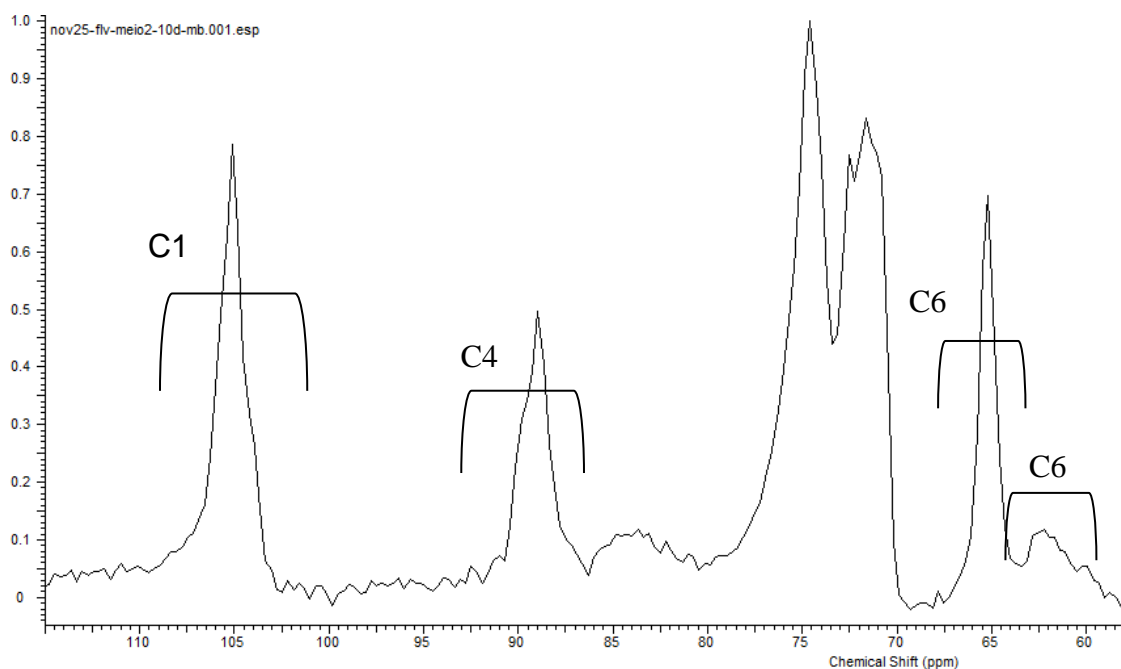
Considerando que o emparelhamento das cadeias ocorre como um fenômeno de pós síntese. A partir de certo comprimento de cadeia esta se torna estacionária pressionando o movimento da bactéria no sentido contrário ao da formação de filme descrito por Hesse e Kondo (2005), com a sigla NOC (*nematic ordered cellulose*), e resulta em um emparelhamento menos efetivo das cadeias de celulose nascentes a partir da CeSa (cellulose synthase) (ROSS; MAYER; BENZAMAN, 1991).

Figura 10 - Espectroscopia de ^{13}C -RMN celulose bacteriana.



Fonte: FARIA-TISCHER, 2014.

Figura 11 – Espectroscopia de ^{13}C -RMN celulose bacteriana produzida em meio gly2+sac8 em 10 dias de fermentação.



5.5 Análise de metabólitos por ressonância magnética nuclear de estado líquido (^1H rmn)

Para estudos de metabólitos e perfis metabólicos, a análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta importante e vantajosa devido à facilidade de preparo das amostras a serem analisadas. Na análise por ^1H rmn em estado líquido, foi realizada a quantificação dos metabólitos presentes nos meios durante o período de 10 dias, onde amostras foram retiradas nos dias 4, 7 e 10 de fermentação (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores percentuais relativos de fontes de carbono adicionadas para cada meio e dos metabólitos observados por ^1H rmn em relação ao tempo em dias. Na última coluna observa-se os valores de pH para cada dia e meio.

composição		glucose	sacarose	alanina	Lactato	leucina	glutamato	treonina	valina	aspartato	lisina	DHA	propileno alicol	pH
gly2+glu4	4d	91,8	2,9	1,8	1,9	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
	7d	73,7	1,9	2,8	11,3	2,0	2,6	1,5	1,3	1,2	1,1	0,0	0,0	4,7
	10d	55,6	10,9	5,7	14,6	4,8	-	2,6	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	3,7
gly2+sac8	4d	4,0	93,6	0,7	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
	7d	0,5	95,3	0,5	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,2	4,7
	10d	0,0	92,5	0,6	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	3,6
gly1+glu2	4d	90,7	0,0	3,1	1,1	4,2	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	5,0
	7d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9
	10d	83,0	1,4	3,1	7,7	3,2	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8
glu 8	4d	96,6	0,0	0,5	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5
	7d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7
	10d	96,4	0,0	0,7	1,5	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8

DHA= diidroxicetona

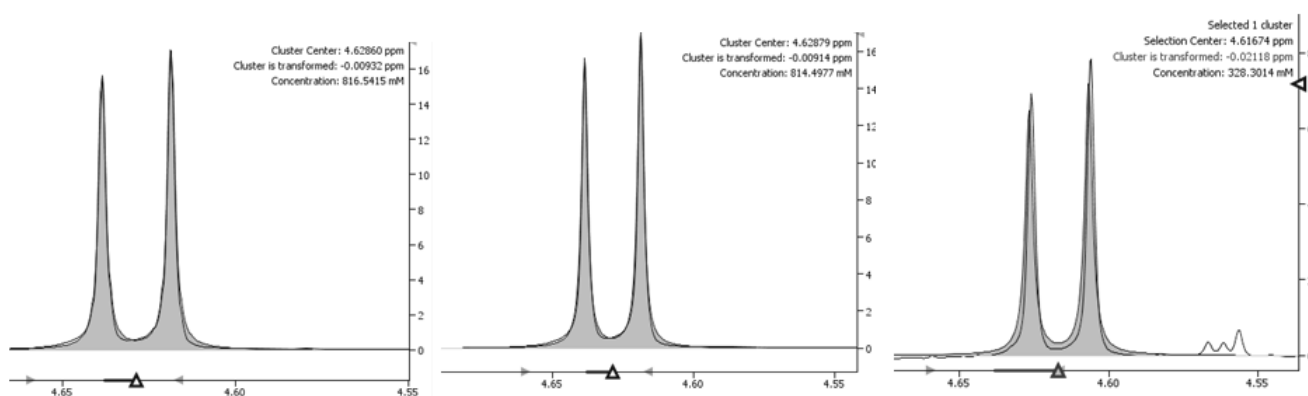
Durante a fermentação por bactéria específica, *G. xylinus*, a síntese microbiana de microfibrilas de celulose é o principal metabólito produzido, porém durante esta síntese outros metabólitos são produzidos devido ao metabolismo microbiano.

Além da identificação de metabólitos o ^1H rmn foi utilizado também para verificação do consumo das fontes de carbono glucose e sacarose durante o período de fermentação. Foi possível observar a queda nas concentrações de glucose, nos meios gly2+glu4, gly1+glu2, no 4º, 7º e 10º dia de fermentação (Figura 12). Dentre esses, o meio glu2+glu4 apresentou o maior consumo de glucose, isso ocorre devido a participação da glucose no início na via biossintética de produção de CB e metabólitos secundários. Já os meios contendo sacarose a presença de glucose se deve devido a quebra do dissacarídeo sacarose em monossacarídeos de glucose,

sendo que o meio com maior concentração de glucose, gly2+sac8, apresentou alta conversão em glucose nos primeiros dias de fermentação (Tabela 4).

No meio gly2+sac8 a concentração de sacarose se manteve alta mesmo no dia 10 da fermentação com 92,5 %, isso se deve a alta concentração em que foi adicionado no meio, sendo que o microrganismo não é capaz de converter essa concentração no período de 10 dias.

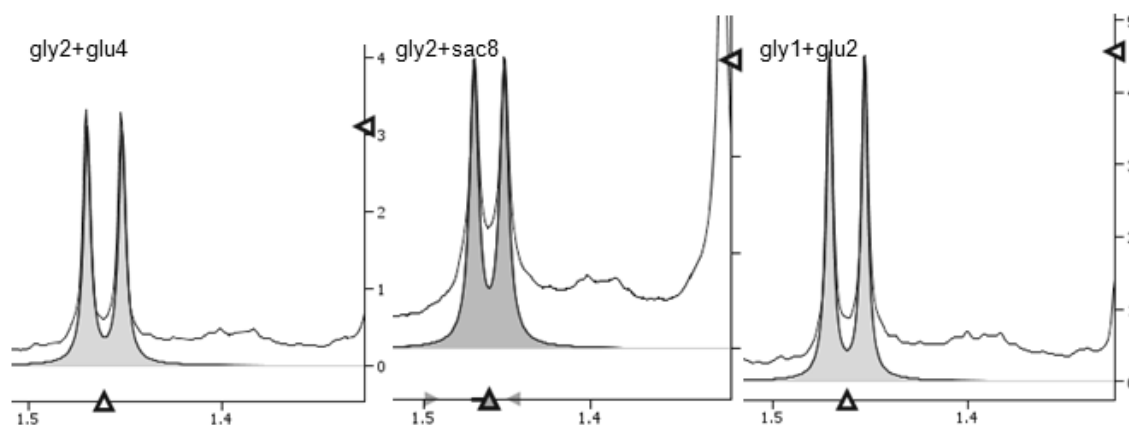
Figura 12 - Quantificação da concentração de glucose α do meio gly2+glu4, observados por ^1H rmn respectivamente nos dias 4 (91,8 %), 7 (73,7 %) e 10 (55,6 %) dia de fermentação.



A maioria dos metabólitos identificados eram aminoácidos, sendo que esses são sintetizados durante o a glicólise ou ainda pelo ciclo do ácido cítrico. A alanina é um aminoácido não essencial encontrado em todos os seres vivos, é sintetizado a partir do piruvato e de aminoácidos com cadeias laterais ramificadas, como valina, leucina e isoleucina, é comumente produzida por aaminação redutora do piruvato

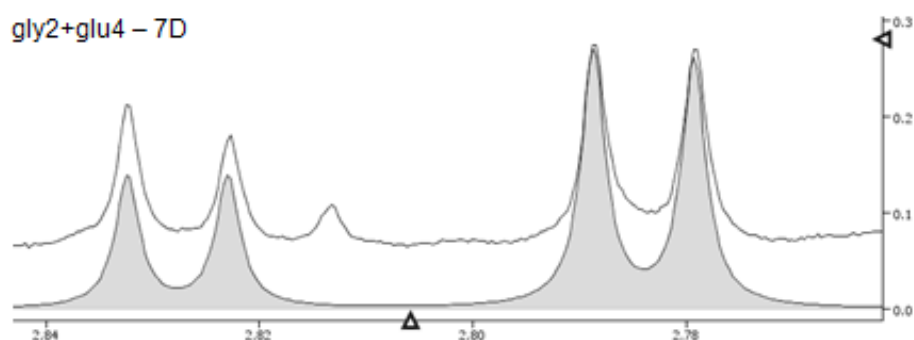
A alanina esteve presente em todos os meios analisados (Figura 13), porém nos meios contendo glicerol a concentração deste metabólito foi maior e em meio contendo apenas glucose, glu8, sua concentração diminuiu com o passar dos dias.

Figura 13 - Quantificação da concentração de alanina nos meios de cultura no 4º dia de fermentação, observados por ^1H rmn.



. A presença de aspartato e dos aminoácidos lisina e treonina estão totalmente ligados, pois o aspartato nas bactérias é precursor da produção destes aminoácidos. O aspartato foi identificado somente no meio gly2+glu4 no dia 7 e no meio gly1+glu2 no dia 4, com pequenas concentrações (Figura 14).

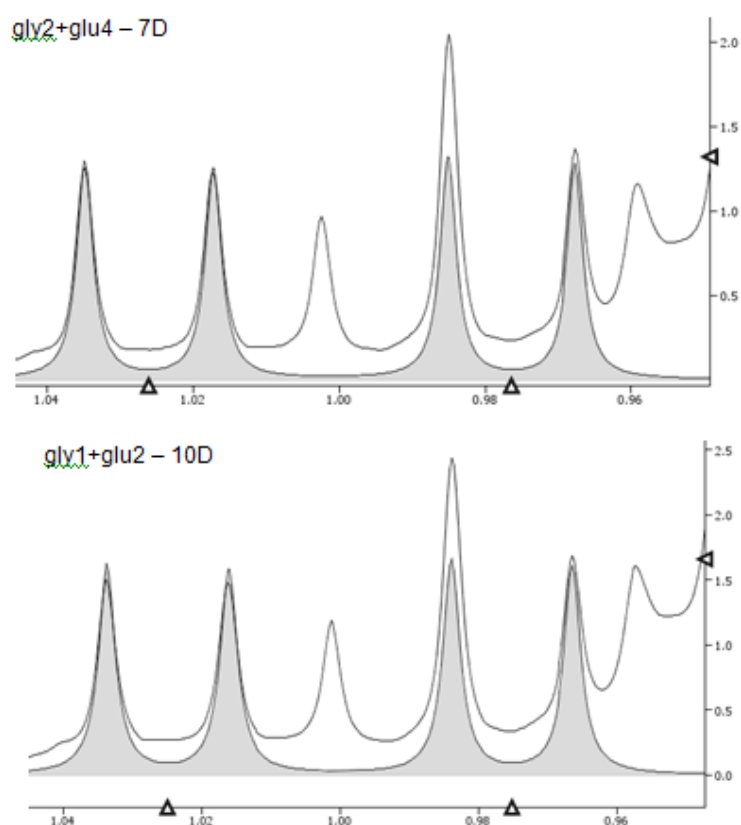
Figura 14 - Quantificação da concentração de aspartato no meio gly2+glu4 observado por ^1H rmn no 7º dia de fermentação.



A Leucina foi detectada pelo método no meio gly2+glu4 onde sua maior concentração foi no dia 10 com 4,8 %, já no meio gly1+glu2 sua maior concentração

foi de 4,2 % detectada no dia 4. Já os meios glu2+sac8 e glu8, não foi possível detectar a presença do metabólito. A valina foi detectada nos apenas nos meios contendo a associação do glicerol com a glucose e em pequenas concentrações (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação da concentração de valina do meio gly2+glu4 e gly1+glu2 observados por ^1H rmn respectivamente nos dias 7 (1,3 %) e 10 (1,7 %) de fermentação.

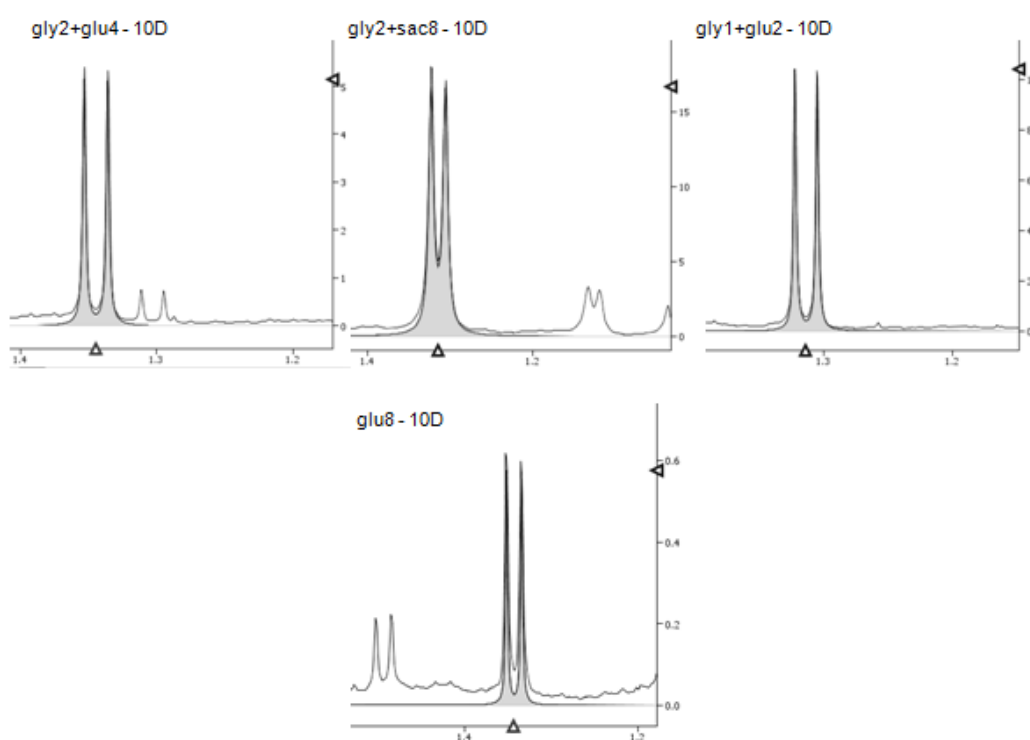


A treonina foi detectada em pequenas quantidades em quase todos os meios como podemos observar. Sua maior concentração foi observada em gly2+glu4 com 2,6 % e nos outros meios variou de 0,4 a 0,7 %. O glutamato foi identificado apenas no dia 7 no meio gly2+glu4. A lisina também foi identificada apenas no meio gly2+glu4 no dia 7 e 10, com concentrações de 1,1 % e 3,4 %. A baixa presença deste aminoácido e do aspartato nos meios, se deve a baixa concentração em que eles se encontraram, sendo assim de difícil identificação. Liu e colaboradores (2015)

realizaram estudo analisando o perfil dos metabólitos produzidos em culturas agitadas e estáticas por *G. xylinus*, através da análise por GC-MS, onde assim como a presente pesquisa, eles também identificaram a presença dos aminoácidos alanina, valina e leucina, devido a seus precursores participarem da via metabólica do microrganismo.

A presença de lactato no meio de cultura foi identificada na análise por ^1H rmn em todos os meios, com maior concentração no dia 10 do meio gly2+sac8 com 14,6 %. Autores relatam a presença de lactato na fermentação por Enterobacteriaceae e o acúmulo de metabólitos primários como acetato e secundário como lactato (Figura 16) (HOMANN et al., 1990; MURARKA et. al, 2008).

Figura 16 - Quantificação da concentração de lactato nos meios de cultura no 7 de 10 dia de fermentação, observados por ^1H rmn.



A DHA é um produto fisiológico das células envolvidas na via metabólica. A DHA é utilizada pela via glicolítica para a geração de ATP. O metabólito diidroxicetona é produzido através da fermentação microbiana de glicerol por

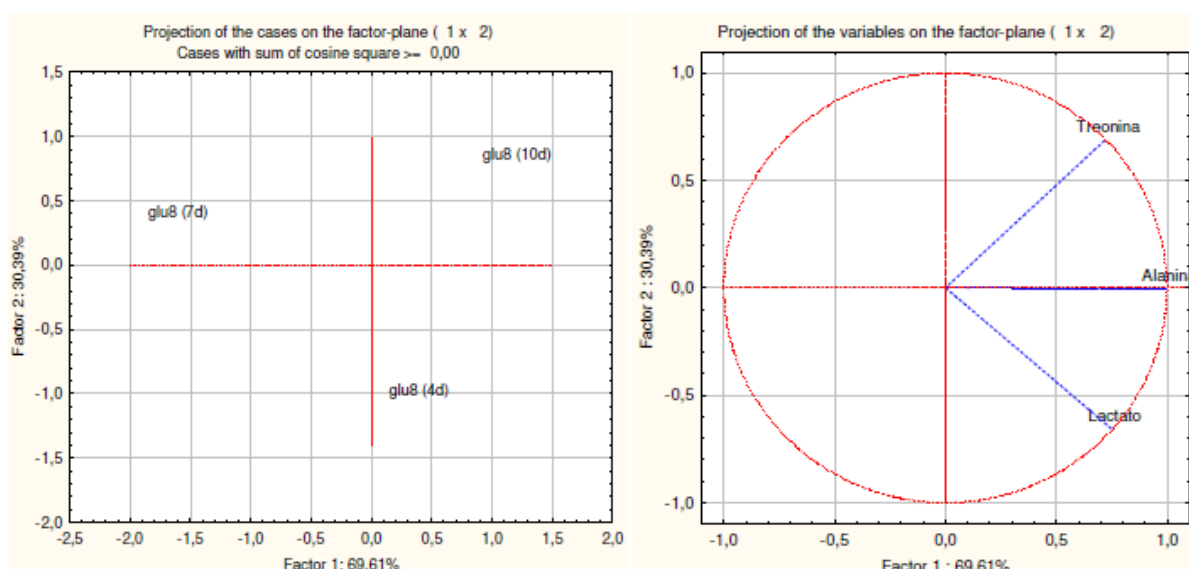
espécies da família *Acetobacter* (STASIAK; BLAZEJAK, 2009; PETERSEN et al., 2004; CLARET et. al., 1994; HEKMAT et. al., 2003). A diidroxicetona é um dos metabólitos mais comumente encontrados nas fermentações com glicerol, porém foi encontrada em pequenas quantidades e em apenas no meio gly2+sac8 no dia 7 com 1,2 % e no dia 10 com 1,3 %.

Vestígios de propileno glicol foram identificados no meio gly2+sac8 no dia 7 com 0,2 %. É relatada a presença de propileno glicol em estudos com bactérias gram-negativas utilizando glicerol como substrato (TEM-DAN; HANEFELD, 2011)

5.6 Análise de Componente Principal (ACP)

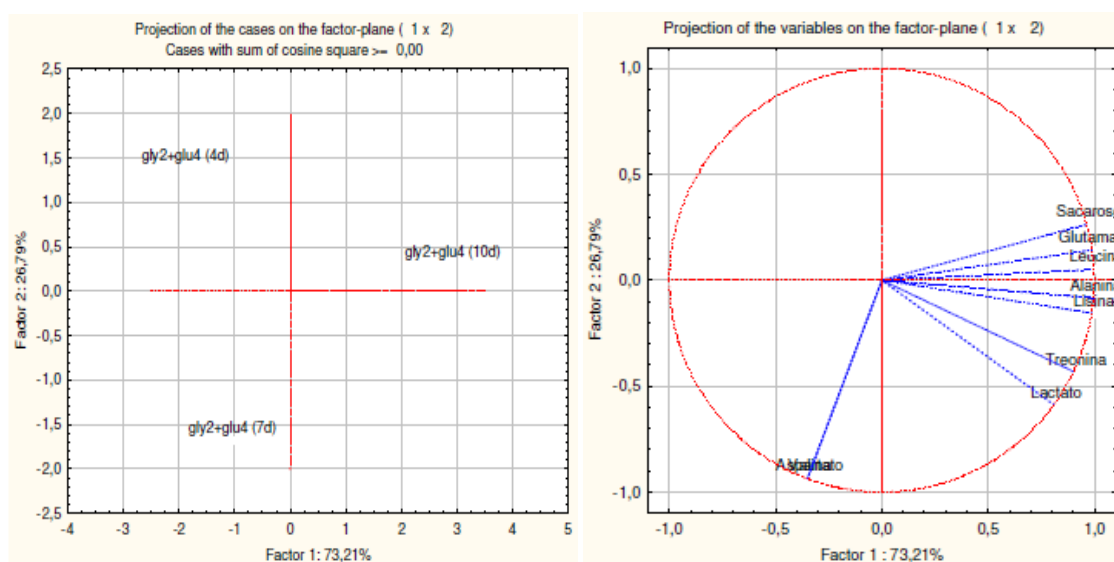
No gráfico de ACP os metabólitos estão representados por vetores, que ao sofrerem decomposição, serão indicados por outros vetores em relação a um eixo de componente principal (CP). Os vetores que mostram alta correlação com o eixo da CP, seja ele, horizontal ou vertical, são aqueles considerados mais longos e, também, são estes que explicam melhor a variabilidade entre as amostras apresentadas nesta componente (JANIASKI, 2011).

Figura 17– Projeções da produção de metabólitos pelo meio glu8 nos dia 4, 7 e 10.



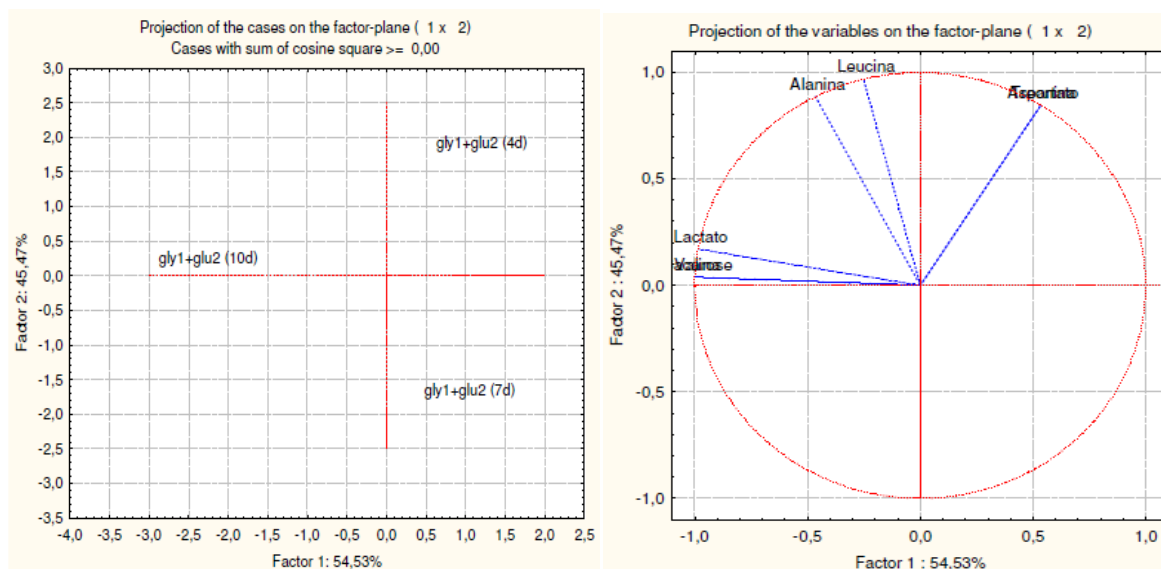
Com base na projeção do meio do glucose 8% (Figura 17), é possível observar através dos vetores a correlação entre os dias de fermentação e os metabólitos produzidos. Apenas três metabólitos foram identificados no meio sendo eles treonina, alanina e lactato. A presença da treonina foi favorecida no dia 10 da fermentação enquanto que lactato no dia 4, já a alanina foi favorecida nos dois períodos de fermentação.

Figura 18– Projeções da produção de metabólitos pelo meio gly2+glu4 nos dias 4, 7 e 10.



Os metabólitos sacarose, alanina, lactato, leucina, treonina e lisina, tiveram suas produções favorecidas no dia 10 de fermentação do meio gly2+glu4. Enquanto que glutamato e aspartato foram favorecidos no dia 7. No quarto dia de fermentação não foi possível observar as projeções dos vetores, devido a pequenas concentrações dos metabólitos produzidos (Figura 18).

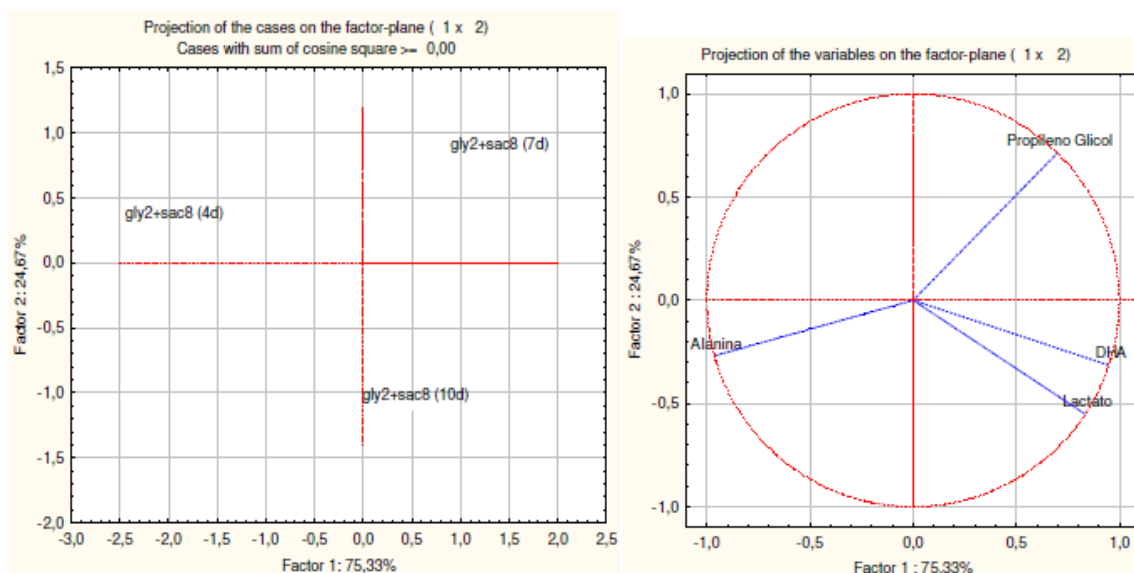
Figura 19 – Projeções da produção de metabólitos pelo meio gly1+glu2 nos dias 4, 7 e 10.



A projeção do meio gly1+glu2 é apresentada na (Figura 19), onde os vetores mostram o favorecimento da produção de metabólitos no dia 10, identificando assim a presença de sacarose, alanina, lactato, leucina e valina. No dia 4 metabólitos também são produzidos, porém em menores concentrações, sendo que o favorecimento é para produção de treonina e aspartato.

No único meio contendo glicerol e sacarose (gly2+sac8) (Figura 20) é possível observar que no dia 4 de fermentação pequenas concentrações de metabólitos foram produzidas sendo que a produção de lactato e DHA não foram favorecidas neste momento, mas sim do 10º dia de fermentação. No 7º dia ocorreu a produção de propileno glicol que não favoreceu a produção da alanina, presente em pequenas concentrações.

Figura 20– Projeções da produção de metabólitos pelo meio glu2+sac8 nos dias 4, 7 e 10.



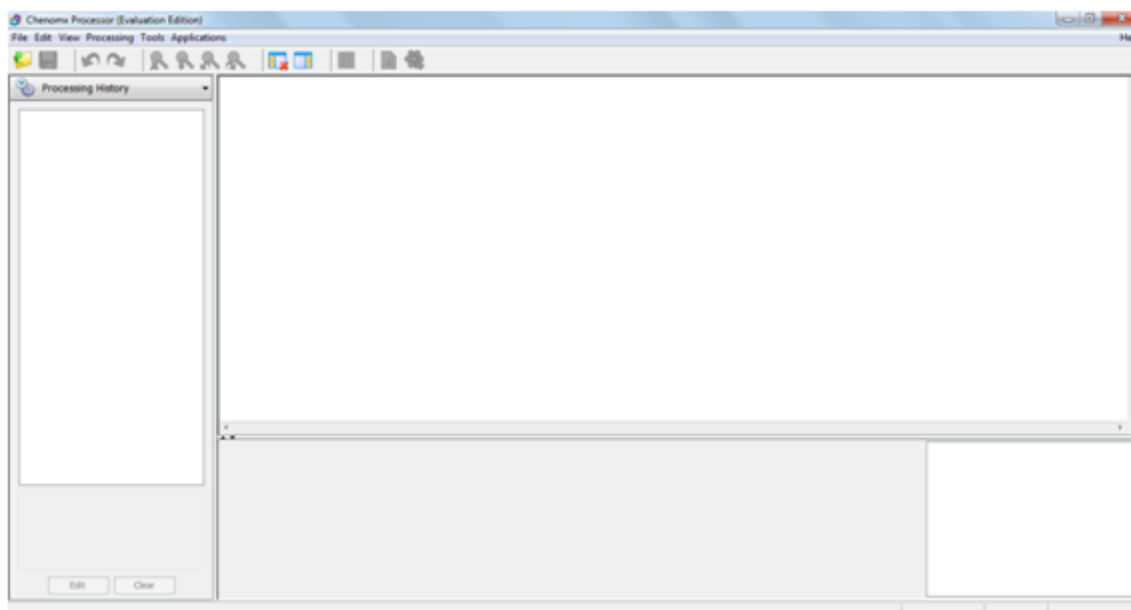
5.7 Processamento dos espectros de RMN de ^1H e extração dos dados

A primeira etapa do processamento dos dados consiste em importar o arquivo de dados gerado pelo espectrômetro de RMN para o programa computacional construído para tratar dados gerados por qualquer espectrômetro de RMN. Os formatos de arquivo que podem ser abertos ou convertidos por outros programas, para serem utilizados (BADDINI; NETTO; TEIXEIRA, 2014).

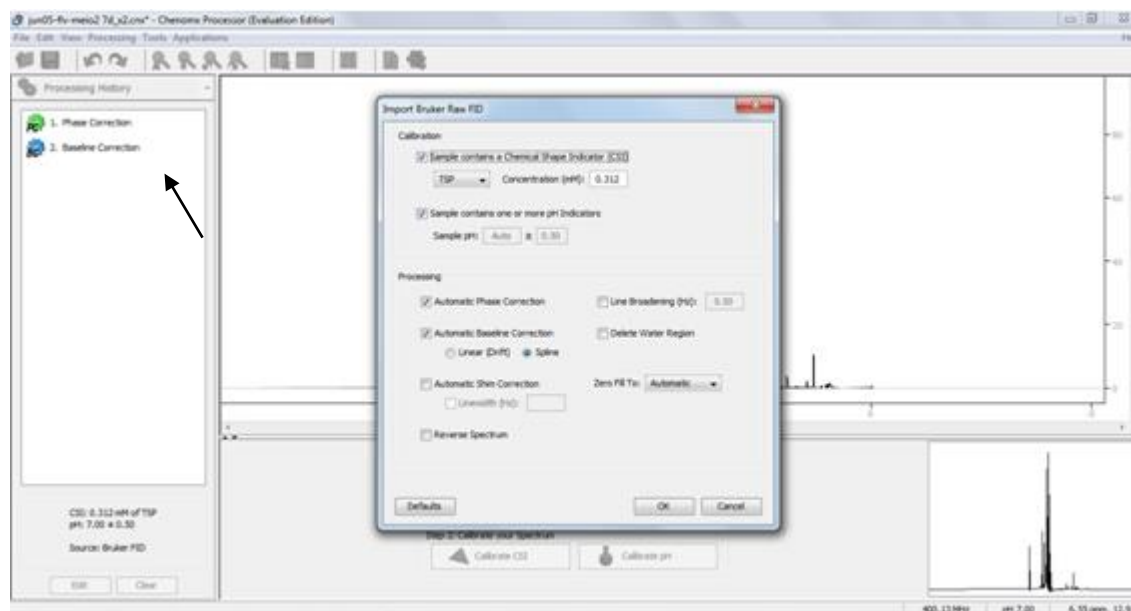
Neste estudo, os programas de processamento de espectros utilizados foram: ACD Labs 12.0 e Chenomx NMR Suite 7.7, nestes programas os arquivos não necessitam ser convertidos.

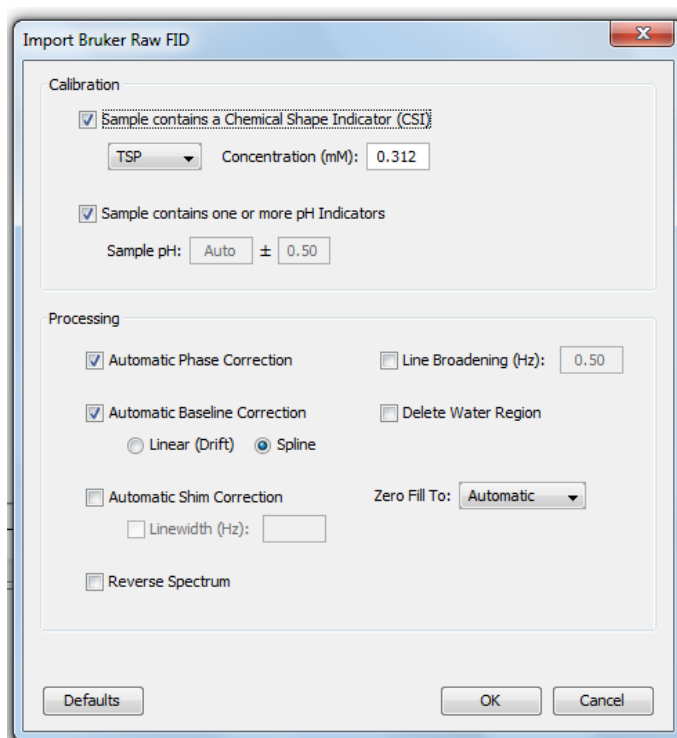
O Chenomx NMR Suite é um conjunto integrado de ferramentas para identificação e quantificação de metabólitos em espectros de RMN, sendo constituído por cinco programas: Chenomx Profiler, Processor, Compound Builder, Spin Simulator e Library Manager (CHENOMX INC., 2015). Para a presente análise foi utilizado somente os programas Chenomx Profiler e Processor.

O primeiro passo para análise de espectro de RMN, é realizar a abertura do Chenomx Processor, este permite a importação de uma grande variedade de espectros e ainda fornece ferramentas necessárias para o processamento e calibração do espectro, para realizar uma análise precisa no modo Profiler. Após a abertura do Chenomx Processor, realizar a importação do arquivo em File → open, ou pelo atalho open.

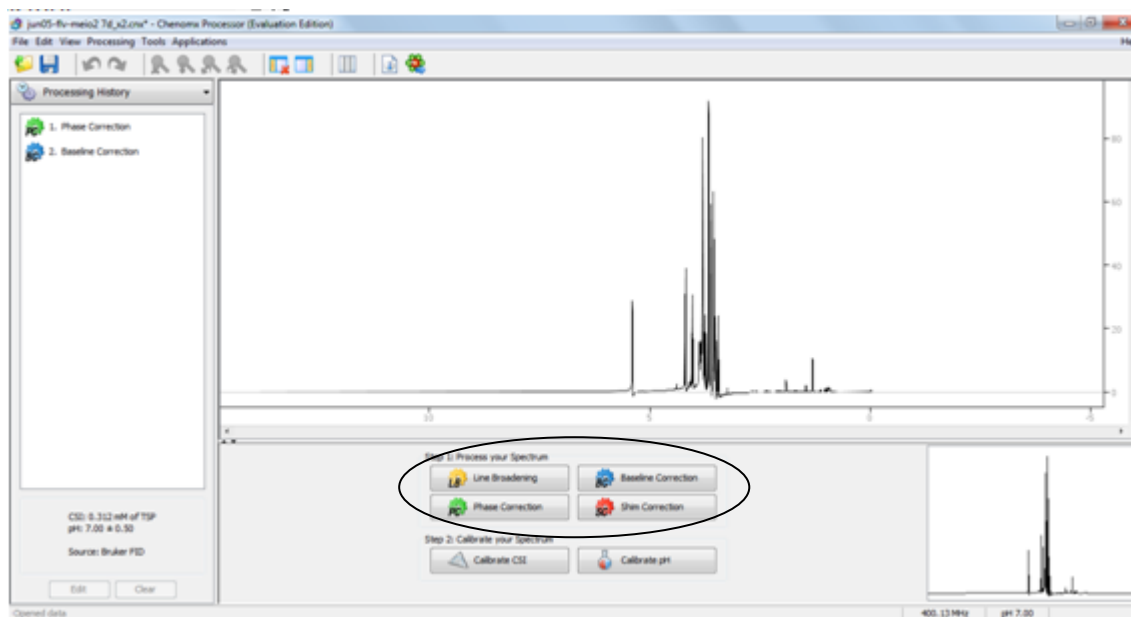


Após a seleção do arquivo, a tela Import Bruker Raw é aberta automaticamente. Esta deve então ser selecionada conforme a amostra, considerando o tipo de calibrante e sua concentração, pH e as formas de processamento desejadas.

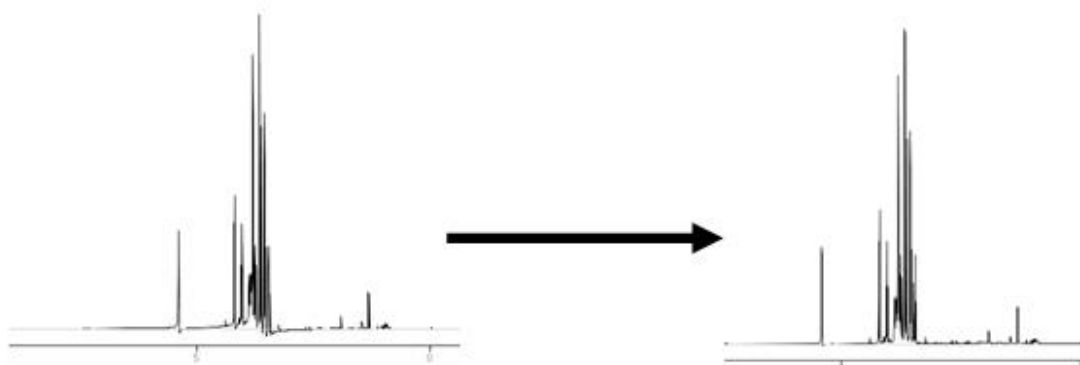
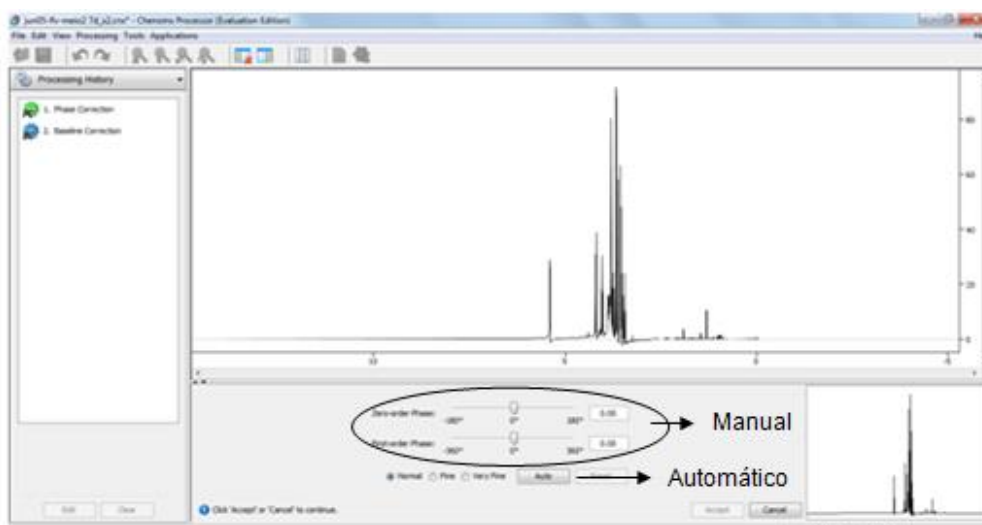




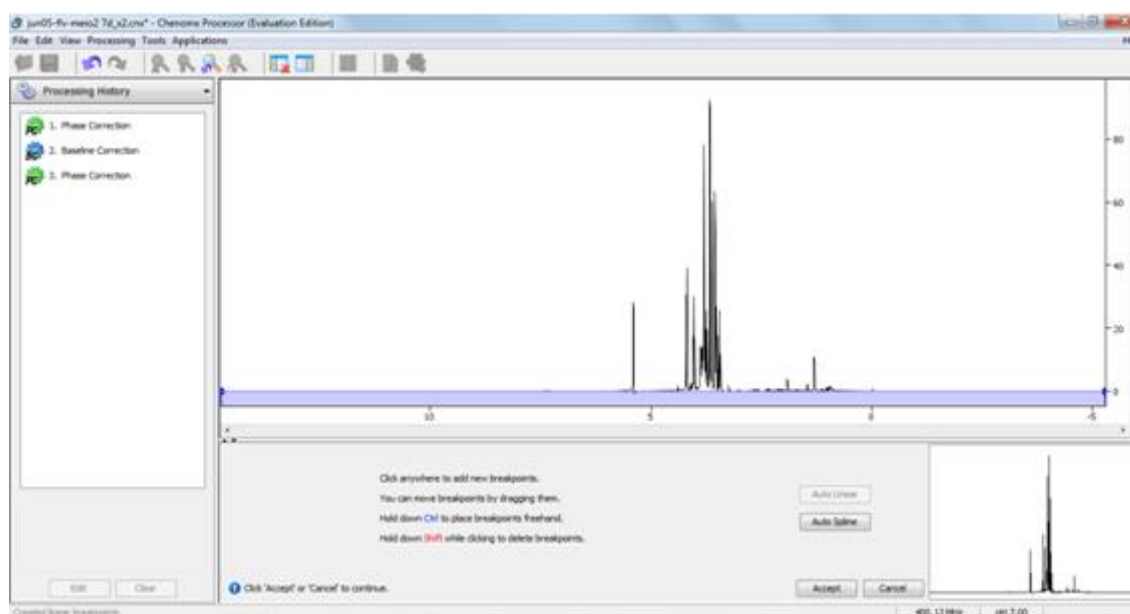
Após o espectro aberto, o programa oferece ferramentas para o processamento do espectro, incluída fase de correção, correção da linha de base, correção do spin, região de exclusão e calibração.

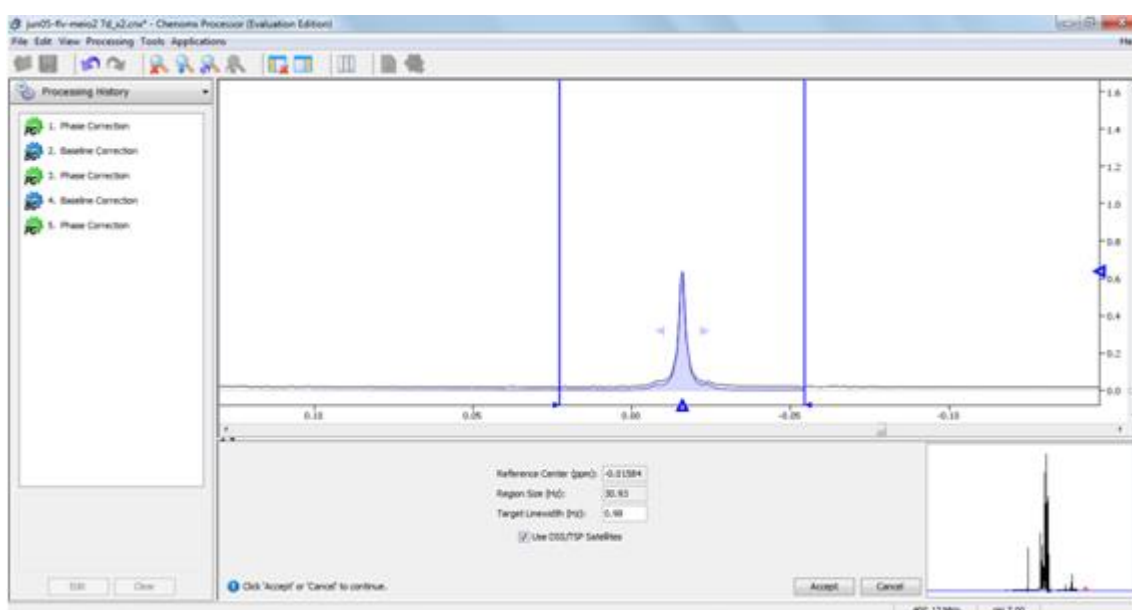


Na opção Fase Correction é realizado os ajustes da fase para isso existem ferramentas automáticas ou manuais.

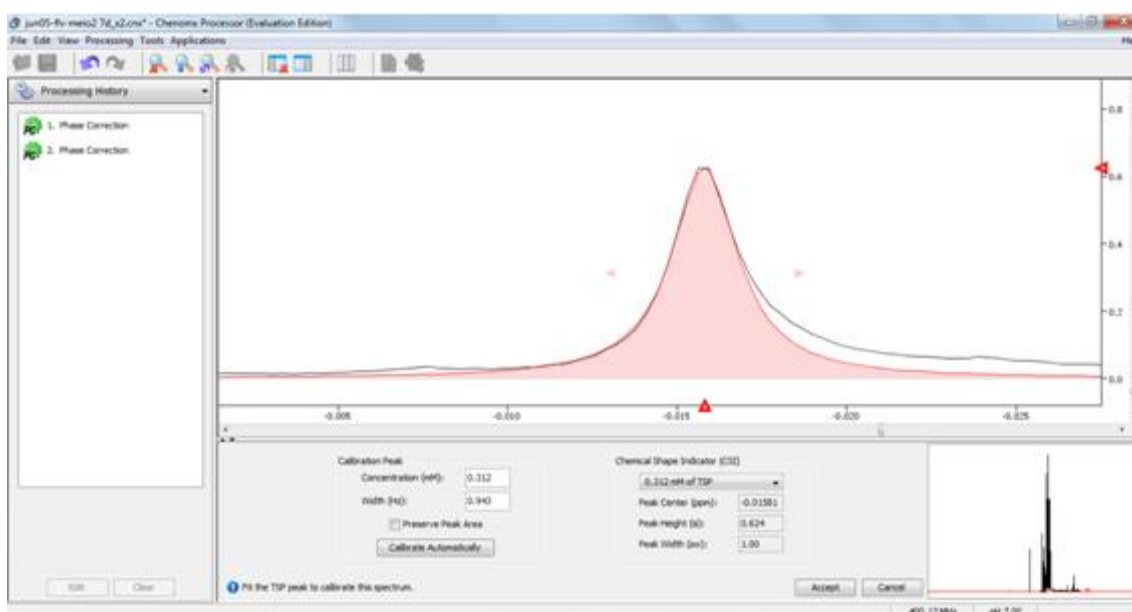


É necessária também a correção da linha de base, no modo simples Auto Linear ou de forma complexa utilizando splines cúbicos em Auto Spline. Foi utilizado o modo Auto Linear.

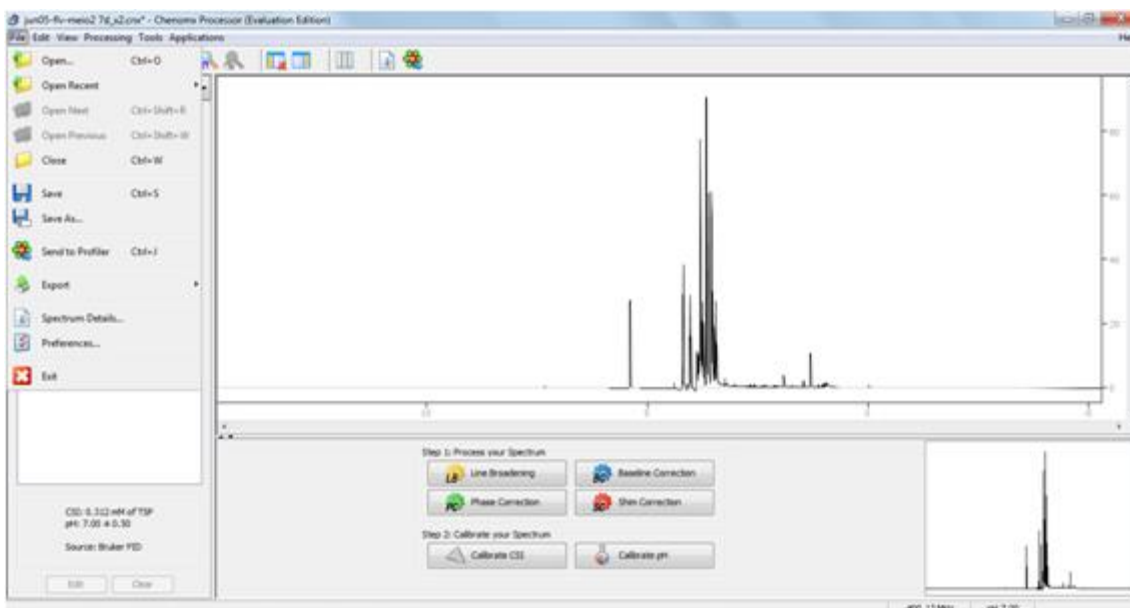




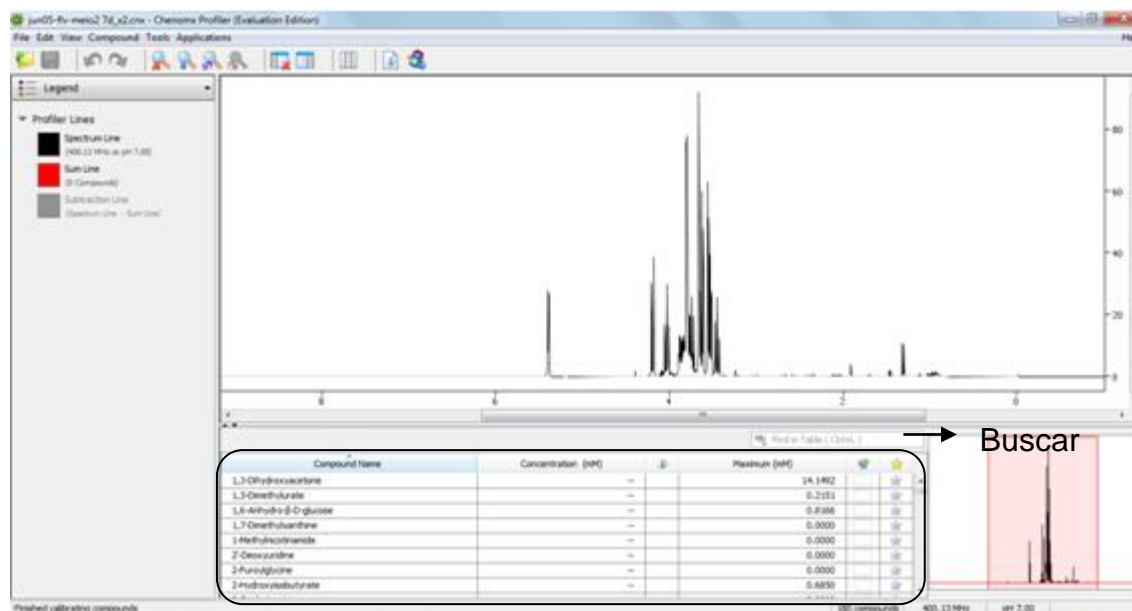
A última etapa é realizar a calibração com um CSI, isso garante resultados quantitativos precisos quando analisados no Profiler.



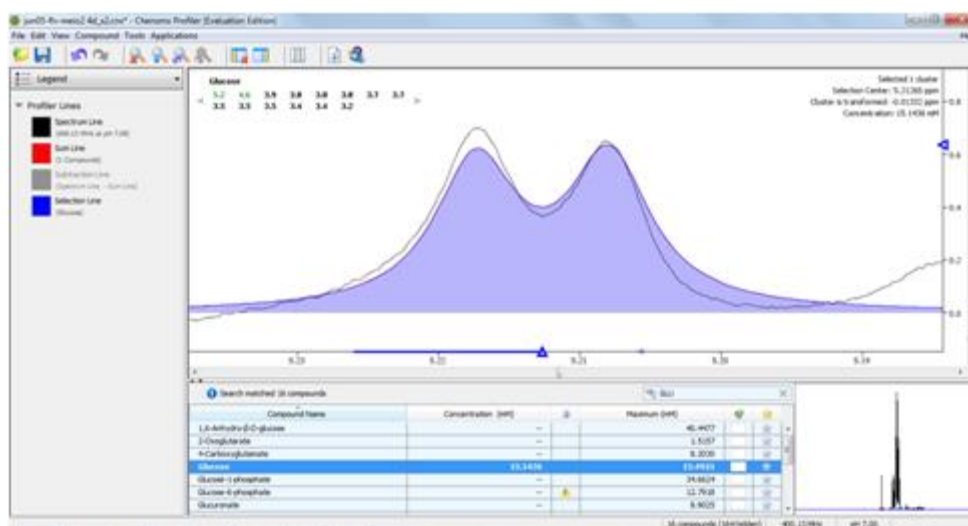
Em seguida o arquivo deve ser salvo em Save e aberto no Chemomx Profiler.



Assim que o arquivo for aberto no Chemomx Profiler, uma lista de possíveis compostos das amostras é fornecida automaticamente pelo programa. A busca de metabólitos pode ser realizada testando todas as opções que o programa fornece ou diretamente no composto de interesse, através opção de busca.



O exemplo a seguir é da glucose, ao clicar no composto de interesse o programa fornece os picos do metabólito (azul) que devem ser ajustados e comparados com os picos da amostra (linha preta). O programa ainda fornece a concentração do metabólito na amostra. Este processo deve ser realizado para cada composto de interesse.



6 CONCLUSÃO

Associação do glicerol com as fontes glucose e sacarose resultou na produção de CB, sendo que o maior rendimento foi obtido em gly1+glu2, com produção de celulose a partir do sétimo dia de fermentação, com rendimento final de 3,5 g% e com um filme espesso e uniforme. Quando utilizado a associação com glicerol, a concentração da fonte de carbono no meio pode ser menor para obtenção de um mesmo rendimento, ou maior, sendo este um aspecto positivo. A associação de glicerol com outras fontes é novidade, sendo que futuramente a pesquisa pode ser realizada com a substituição de glicerol p.a por glicerol resíduo do biodiesel, na busca de um baixo custo de produção.

As membranas de celulose bacteriana analisadas por espectroscopia de RMN em estado sólido apresentaram sinais característicos para celulosas cristalinas do tipo Cel I. Observou-se uma clara tendência para uma maior cristalinidade nas membranas com 7 dias de fermentação com cristalinidades similares variando entre 67,6 IC% a 79,4 IC%, com destaque para o meio gly2+sac8 com valor de 79,4 IC%. O rendimento em g % da associação entre glicerol e sacarose (gly2+sac8) não foi alta, porém obteve-se uma alta cristalinidade diante desta associação

Os produtos do metabolismo encontrados nos meios por análise de espectroscopia de RMN em estado líquido foram similares, com destaque para a produção de alanina e lactato que estiveram presente em todos os meios. A leucina e a treonina estiveram presentes em diversos meios, ainda em pequenas quantidades foi encontrado glutamato, valina, aspartato, lisina propileno glicol e diidroxiketona, os dois últimos foram observados apenas em meios contendo sacarose. A produção de metabólitos nos meios contendo associação de glicerol e glucose, foi maior, em contrapartida dois metabólitos com interesse comercial foram identificados apenas no meio contendo sacarose. As maiores produções de metabólitos foram identificadas no dia 10 do processo fermentativo. Os metabólitos identificados não tiveram relação com o rendimento de celulose produzida.

O manual realizado para identificação de metabólitos por RMN será que importância para a comunidade acadêmica, sendo necessário o conhecimento para um melhor aproveitamento do programa.

Desta forma a pesquisa foi importante na busca de meios com associação de compostos com glicerol, que futuramente podem ser realizadas com o glicerol resíduo do biodiesel, para obtenção de membranas de celulose com baixo custo de produção. Além da busca dos metabólitos produzidos pelo microrganismo durante este processo.

REFERÊNCIAS

BEN-BASSAT, A. BRUNER, R. SHOEMAKER, S. ALONI, Y. WONG, H. JOHNSON, D. C. NEOGI, A. N. Reticulated cellulose and methods and microorganisms for the production thereof. **US patent 5079162**. 1992.

BODIN, A., BÄCKDAHL, H., FINK, H., GUSTAFSSON, L., RISBERG, B., GATENHOLM, P. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 425-434, 2007.

BROWN, A. On an Acetic Ferment Which Forms Cellulose. **Journal of the Chemical Society**. v. 49, p. 432-439, 1986.

BLACK, C. S. **Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by immobilized *Gluconacetobacter xylinus* cells**. 2013. Tese de Doutorado. University of Waikato.

BUDHIONO, A., ROSIDI, B., TAHER, H., IGUCHI, M. Aspectos cinéticos de formação de celulose bacteriana no sistema de cultura nata-de-coco. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 2, p.137-143, 1999.

CARREIRA, P. M. C. Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. 2010.

CHÁVEZ-PACHECO, J. L., MARTÍNEZ-YEE, S., CONTRERAS, M. L., GÓMEZ-MANZO, S., MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J., & ESCAMILLA, J. E. Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1130-1140, 2005.

CHAWLA, P. R., BAJAJ, I. B., SURVASE, S. A., & SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, Mumbai, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

CHENG, H. P., WANG, P. M., CHEN, J. W., WU, W. T. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 125-132, 2002.

CLARET, C., SALMON, J. M., ROMIEU, C., BORIES, A. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 359-365, 1994.

D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. **Microbiology**, Washington, v. 150, n. 8, p. 2497-2502, 2004.

DELMER, D.P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **The Plant Cell**, Jerusalem, v. 7, n. 7, p. 987, 1995.

DONINI, Í. A., DE SALVI, D. T., FUKUMOTO, F. K., LUSTRI, W. R., BARUD, H. S., MARCHETTO, R., RIBEIRO, S. J. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

FARIA-TISCHER, P. C., TISCHER, C. A., HEUX, L., LE DENMAT, S., PICART, C., SIERAKOWSKI, M. R., PUTAUX, J. L. Preparation of cellulose II and III I films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 167-173, 2015.

FINK, H. P. PURTZ, H. J. BOHN, A. KUNZE, J. Investigation of the supramolecular structure of never dried bacterial cellulose. **Macromolecular Symposia**, v. 17, p. 120- 207, 1997.

GELIN, K., A. BODIN, P. GATENHOLM, A. MIHRANYAN, K. EDWARDS, AND M. Stromme, Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. **Polymer**, 2007. **48**(26): p. 7623-7631.

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, 2009.

HABE, H.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; SAKAKI, K . Biotechnological production of Dglyceric acid and its application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 445-452, 2009.

HEKMAT, D.; BAUER, R.; FRICKE, J. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 26, n. 2, p. 109-116, 2003.

HELLER, K. B.; LIN, E. C.; WILSON, T. Hastings. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 274-278, out. 1980.

HEO, M.; SON, H. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter sp.* A9 in shaking cultures. **Biotechnol. Appl. Biochem.** **36**: 41-45, 2002.

HESSE, S.; KONDO, T.. Behavior of cellulose production of *Acetobacter xylinum* in 13 C-enriched cultivation media including movements on nematic ordered cellulose templates. **Carbohydrate polymers**, v. 60, n. 4, p. 457-465, 2005

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

HWANG, J. W. YANG, Y. K. HWANG, J. K. PYUN, Y. R. KIM, Y. S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, p. 183-188, 1999.

HOMANN, T., TAG, C., BIEBL, H., DECKWER, WD, SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 121-126, 1990.

HORNUNG, M. LUDWIG, M. SCHMAUDER. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (Part 3). **Engineering in Life Science**, v. 7, n. 1, p. 35-41, 2007.

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

JANIASKI, D. R. **Características sensoriais, químicas e físicas de iogurtes e bebidas lácteas sabor morango de marcas comerciais**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Programa de Pós graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 101-106, 1998.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K.. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, Kochi, v. 4, n. 6, p. 478-482, mar. 2005.

KIMURA, S., CHEN, H. P., SAXENA, I. M., BROWN, R. M., ITOH, T. Localization of c-di-GMP-Binding Protein with the Linear Terminal Complexes of *Acetobacter xylinum*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5668-5674, jun. 2001.

KLECHKOVSKAYA, V. V., BAKLAGINA, Y. G., STEPINA, N. D., KHRIPUNOV, A. K., BUFFAT, P. A., SUVOROVA, E. I., GLADCHENKO, S. V. Structure of cellulose *Acetobacter xylinum*. Crystallography **Reports**, Russia, v. 48, n. 5, p. 755–762, 2003.

KLEMM, D., HEUBLEIN, B., FINK, H. P., & BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D. SCHUMANN, D. KRAMER, F. HEBLER, N. HORNUNG, M. SCHMAUDER, H-S. MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KRYSTYNOWICZ, A. KOZIOŁKIEWICZ, M. WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A. BIELECKI, S. KLEMENSKA, E. MASNY, A. PŁUCIENNICZAK, A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 691-698, 2005.

KONTTURI, E.; TAMMELIN, T.; ÖSTERBERG, M. Cellulose_models films and the fundamental approach. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 1287-1304, 2006.

KOYAMA, M. HELBERT, W. IMAI, T. SUGIYAMA, J. HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 9091–9095, 1997.

LEE, J. W., DENG, F., YEOMANS, W. G., ALLEN, A. L., GROSS, R. A., KAPLAN, D. L. Direct Incorporation of Glucosamine and N-Acetylglucosamine into Exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* (= *Acetobacter xylinum*) ATCC 10245: Production of Chitosan-Cellulose and Chitin-Cellulose Exopolymers. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 9, p. 3970-3975, 2001.

LEE, K. Y., BULDUM, G., MANTALARIS, A., BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10-32, 2014.

LEHNINGER, Albert L. **Lehninger Principios En Bioquímica**. Editorial Omega, 2002.

LI, C.; LESNIK, K. L.; LIU, H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. **Energies**, v. 6, n. 9, p. 4739-4768, 2013.

LIU, M., ZHONG, C., WU, X. Y., WEI, Y. Q., BO, T., HAN, P. P., & JIA, S. R. Metabolomic profiling coupled with metabolic network reveals differences in *Gluconacetobacter xylinus* from static and agitated cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 85-98, 2015.

LIN, F. C., BROWN, R. M., COOPER, J. B., DELMER, D. P. Synthesis of fibrils in vitro by a solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*. **Science**. Washington, v. 230, n. 4727, p. 822-825, 1985.

LU, L., WEI, L., ZHU, K., WEI, D., HUA, Q. Combining metabolic engineering and adaptive evolution to enhance the production of dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in a low-cost way. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 317-324, 2012.

MATSUOKA, M., TSUCHIDA, T., MATSUSHITA, K., ADACHI, O., YOSHINAGA, F. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 575-579, 1996.

MIKKELSEN, D., FLANAGAN, B. M., DYKES, G. A., & GIDLEY, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576-583, ago. 2009.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Física, caracterização estrutural, mecânica e térmica da celulose bacteriana por *G. hansenii* NCIM 2529. **polímeros de carboidratos**, v. 106, p. 132-141, 2014.

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A.. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. **Iran J Biotechnol**, Shiraz, v. 9, p. 94-101, 2011.

MURARKA, A., DHARMADI, Y., YAZDANI, S. S., GONZALEZ, R. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of

fuels and chemicals. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1124-1135, 2008.

NABE, K., IZUO, N., YAMADA, S., CHIBATA, I. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. **Applied and environmental microbiology**, Yodogawa-ku, v. 38, n. 6, p. 1056-1060, 1979.

NGUYEN, V. T. F., B., GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. . Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Current microbiology**, v. 57, n. 5, p. 449-453, 2008.

NAKAGAITO, A.; IWAMOTO, S.; YANO, H. bacteriana celulose: a morfologia final celulose nano-escalar para a produção de compósitos de alta resistência. **Física Aplicada A** , v 80, n. 1, p. 93-97, 2005.

PANTZE, A. **Studeis of ester formation on a cellulose matrix**. 2006. 81f. Licentiate Thesis - Lulea University of Technoilogy. Skelleftea, 2006.

PARK, S., VENDITTI, R. A., JAMEEL, H., PAWLAK, J. J. Changes in pore size distribution during the drying of cellulose fibers as measured by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate polymers**, v. 66, n. 1, p. 97-103, 2006.

PECORARO, E., MANZANI, D. MESSADDEQ, Y. RIBEIRO, S.J.L. Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications, in Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. 2008.

PETERSEN, A. B.; WULF, H. C.; GNIADDECKI, R.; GAJKOWSKA, B. Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured keratinocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 2, p. 173-186, 2004.

RAMANA, K.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 245-248 (2000).

RECOUVREUX, D. O. S. Produção de celulose bacteriana: identificação do Operon bcs e produção de biofilme celulósico por *Chromobacterium violaceum*. 2004

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

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 2, p. 613-622, 2012.

SEIFERT, M., HESSE, S., KABRELIAN, V., KLEMM, D. Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 463-470, 2004.

SHIBAZAKI, H.; KUGA, S.I.; OKANO, T. Mercerization and acid hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, n. 2, p. 75-87, 1997.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J.. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SON, H. J., HEO, M. S., KIM, Y. G., & LEE, S. J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-5, 2001.

SPINOSA, W. A. Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre. 2002. 215 f. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

STASIAK, L.; BLAZEJAK, S.. Acetic acid bacteria-perspectives of application in biotechnology-a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 59, n. 1, 2009.

STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; BŁAŻEJAK, S.; MIKLASZEWSKA, A. Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *Gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone. **Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria**, v. 10, 2011.

TEN DAM, J.; HANEFELD, Ulf. Renewable chemicals: dehydroxylation of glycerol and polyols. **ChemSusChem**, v. 4, n. 8, p. 1017-1034, 2011.

TODA, K., ASAKURA, T., FUKAYA, M., ENTANI, E., & KAWAMURA, Y. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 228-231, 1997.

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, 2013.

VELASCO-BEDRÁN, H.; LÓPEZ-ISUNZA, F. The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1180-1190, 2007.

WANG, Z., ZHUGE, J., FANG, H., & PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 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, 1998.

WEINHOUSE, H. A. I. M.; BENZIMAN, M. Phosphorylation of glycerol and dihydroxyacetone in *Acetobacter xylinum* and its possible regulatory role. *Journal of bacteriology*, v. 127, n. 2, p. 747-754, 1976.

WHITE, D. G.; BROWN JR, R. MALCOLM. Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose. **Cellulose and wood-chemistry and technology**. Wiley, New York, v. 573, 1989.

WILLIAMNS, S, CANNON, R. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied Environment Microbiology**, v. 55, p. 2448-2452, 1989.

YAMADA, H., NAGAO, A., NISHISE, H., TANI, Y. Formation of Glycerol Dehydrogenase by Microorganismst. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 2325-2331, 1982.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YAMANAKA, S., WATANABE, K., IGUCHI, M., NISHI, Y., Production, property, and application of bacterial cellulose. *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, **72**(9): p. 1039-1044, 1998

YANG, H. Y., CHEN R., LEE H., ZHENG D. H., Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, v. 86, p.1781–1788, 2007.

YOSHINAGA, F.; TONOUCHE, N.; WATANABE, K.. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 61, n. 2, p. 219-224, 1997.

ZHANG, X.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, Tianjin, v. 76, n. 8, p. 2397-2401, 2010.

ZHONG, C., ZHANG, G. C., LIU, M., ZHENG, X. T., HAN, P. P., & JIA, S. R. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied microbiology and biotechnology*, p. 1-11, 2013.

ZHU, M. M.; LAWMAN, P. D.; CAMERON, D. C. Improving 1, 3-Propanediol Production from Glycerol in a Metabolically Engineered *Escherichia coli* by Reducing Accumulation of sn-Glycerol-3-phosphate. *Biotechnology progress*, v. 18, n. 4, p. 694-699, 2008.